

Aus dem molekularbiologischen
Forschungslabor der HNO-Klinik und der
Klinik für Neonatologie – Campus Virchow Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Hypoxie-induzierter Zelltod und
Veränderungen der HIF-1-Aktivität
in PC12-Zellen**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Nico Nawid Charlier

aus: Frankfurt am Main

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. Gross
2. Prof. Dr. med. W. Jelkmann
3. PD Dr. T. Kietzmann

Datum der Promotion: 09.02.2004

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	<u>7</u>
1.1	HYPOXIE/ISCHÄMIE IN DER PERINATALPERIODE	7
1.2	MECHANISMEN DER ZNS-SCHÄDIGUNG DURCH HYPOXIE/ISCHÄMIE	7
1.2.1	Nekrose	7
1.2.2	Apoptose	8
1.2.3	Neuropathologische Formen der hypoxisch/ischämischen ZNS-Schädigung	9
1.2.4	Langzeitschädigung des ZNS durch Hypoxie/Ischämie	10
1.3	FAKTOREN, DIE DEN ZELLTOD BEEINFLUSSEN	10
1.3.1	Hypoxia inducible Factor 1	10
1.3.2	Nervenwachstumsfaktor	12
1.3.2.1	Nervenwachstumsfaktor und der Zelltod	12
1.3.2.2	Nervenwachstumsfaktor und die Zellprotektion	12
1.3.3	Einfluss von Temperatur auf den Zelltod	13
1.4	EXPERIMENTELLE MODELLE IN DER HYPOXIEFORSCHUNG	14
1.4.1	PC12-Zellen als Modell für neuronale Zellen	14
1.4.2	Antisense HIF-1 alpha	14
1.4.3	Methoden der Zelltodmessung	15
1.4.4	Methoden der HIF-1 Bestimmung	15
2	<u>PROBLEMSTELLUNG</u>	<u>19</u>
3	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>21</u>
3.1	MATERIAL	21
3.1.1	Zellkulturgefäße	21
3.1.2	Seren	21
3.1.3	Zellkulturmedien	21
3.1.4	Wachstumsfaktoren	21
3.1.5	Antibiotika	22
3.1.6	Puffer	22
3.1.7	Substratlösung für photometrische Detektion	22

3.1.8	Plasmide	22
3.1.9	Kommerzielle Kits	23
3.2	METHODEN	23
3.2.1	PC12-Zellen	23
3.2.2	Kulturbedingungen	23
3.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	23
3.2.4	Zellzahlbestimmung	24
3.2.5	Hypoxie	24
3.2.6	Transfektion	24
3.2.7	Reporterplasmide	25
3.2.8	HIF-1 Berechnung	25
3.2.9	Klonierung des Antisense-Konstruktes	25
3.2.10	Messung der Luciferase	25
3.2.11	Laktat Dehydrogenase im Medium	26
3.2.12	Mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität	26
3.2.13	Durchflusszytometrie	26
3.2.13.1	Analyse und Auswertung der Durchflusszytometrie	27
3.2.14	Statistische Analyse	27
4	ERGEBNISSE	28
4.1	VERSUCHSAUFBAU	28
4.2	HYPOXIE UND DER ZELLTOD	30
4.2.1	LDH im Medium	30
4.2.2	Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität	31
4.2.3	Durchflusszytometrische Analyse	32
4.2.3.1	PC12-Zellen in Suspension	32
4.2.3.2	PC12-Zellen in Suspension und mit NGF geprint	34
4.2.3.3	Adhärente PC12-Zellen auf Kollagen	36
4.2.3.4	Adhärente PC12-Zellen auf Kollagen mit NGF	37
4.3	HYPOXIE UND DIE HIF-1-AKTIVITÄT	39
4.3.1	Transfektionseffizienz	39
4.3.2	Transfektionsoptimierung	41
4.3.2.1	Plasmidgehalt	41

4.3.2.2	Lipidgehalt	43
4.3.2.3	Zellzahl	44
4.3.3	Effekte auf die Expression des Kontrollvektors pGL3	46
4.3.3.1	Kontrollvektor pGL3 bei PC12-Zellen in Suspension und der Einfluss von NGF	46
4.3.3.2	Kontrollvektor pGL3 bei adhären PC12-Zellen und der Einfluss von NGF	47
4.3.4	HIF-1-Aktivität von PC12-Zellen, unmittelbar vor der Hypoxie transfiziert	49
4.3.5	HIF-1-Aktivität von PC12-Zellen in Suspension und der Einfluss von NGF	51
4.3.6	HIF-1-Aktivität von adhären PC12-Zellen und der Einfluss von NGF	52
4.4	ANTISENSE HIF-1 ALPHA	53
4.4.1	Transfektionseffizienz der Antisense-Zelllinien	54
4.4.2	Variabilität der HIF-1-Aktivität der Antisense-Zelllinie	54
4.4.3	HIF-1-Aktivität der Zelllinien WT, CMV, 19P in Suspension	56
4.4.4	HIF-1-Aktivität der Zelllinien WT, CMV, 19P adhären auf Kollagen	56
4.4.5	HIF-1-Aktivität der Zelllinien WT, CMV, 19P adhären auf Kollagen mit NGF	57
4.4.6	Antisense-Einzelzellklone	57
4.4.6.1	HIF-1-Aktivität eines Antisense-Einzelzellklons	57
4.4.6.2	Zelltod des Antisense-Einzelzellklons	58
4.5	EINFLUSS DER TEMPERATUR	59
4.5.1	Apoptose und Nekrose nach Hypoxieexposition	60
4.5.2	Kontrollvektor pGL3 bei PC12-Zellen in Suspension und der Einfluss der Temperatur	61
4.5.3	Abhängigkeit der HIF-1-Aktivität von der Temperatur	61
5	<u>DISKUSSION</u>	63
5.1	ZELLTOD	63
5.1.1	Einfluss von Hypoxie auf den Zelltod	63
5.1.2	Einfluss von NGF auf den Zelltod	63
5.1.3	Einfluss von Temperatur auf den Zelltod	64
5.2	HIF-1-AKTIVITÄT	65
5.2.1	Transfektionseffizienz	65
5.2.2	Einfluss von NGF und Hypoxie auf den Kontrollvektor pGL3	65
5.2.3	Einfluss von Temperatur auf den Kontrollvektor pGL3	66
5.2.4	Einfluss von NGF auf die HIF-1-Aktivität und mögliche Mechanismen	66
5.2.5	Einfluss von NGF auf die HIF-1-Aktivität bei Transfektion unmittelbar vor Hypoxie	68

	6
5.2.6 Einfluss der Temperatur auf die HIF-1-Aktivität	68
5.3 HIF-1 ALPHA ANTISENSE PC12-ZELLEN	69
5.4 BEZIEHUNGEN ZWISCHEN HIF-1-AKTIVITÄT UND DEM ZELLTOD	69
<u>6 ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>72</u>
<u>7 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN</u>	<u>74</u>
<u>8 LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>76</u>

1 Einleitung

1.1 Hypoxie/Ischämie in der Perinatalperiode

Die perinatale Hypoxie/Ischämie des Feten und Neugeborenen gehört zu den häufigsten Ursachen neuronaler Schädigung. Es wird geschätzt, dass perinatale Asphyxie ungefähr bei 3/1000 Neugeborenen auftritt (Chen, 1997). Bei 20-30 % der betroffenen Neugeborenen führt dies zu neurologischen Folgeschäden wie zerebraler Paresen, geistiger Behinderung und Epilepsie (Volpe, 1995; Carter et al., 1993; Hill, 1991). Zu einer perinatalen neuronalen Schädigung kommt es meistens durch eine akute, intrauterine Asphyxie (Volpe, 1995), die aus einer Verminderung der uterinen oder umbilikalen Durchblutung resultiert (Jensen und Berger, 1991).

Um die normale Entwicklung des Gehirns zu gewährleisten, ist eine adäquate Sauerstoffzufuhr notwendig. Während es bei einer milden Hypoxie möglich ist, die intrazelluläre ATP-Konzentration durch gesteigerte anaerobe Glykolyse aufrecht zu erhalten (Berger et al., 1993), kann eine akute Verminderung der fetalen Sauerstoffzufuhr zu einem Mangel an ATP und zum Zelluntergang führen (Berger et al., 1991). Neuronen sind besonders empfindlich gegenüber Hypoxie/Ischämie.

1.2 Mechanismen der ZNS-Schädigung durch Hypoxie/Ischämie

Die ZNS-Schädigung manifestiert sich während der Fetal- bzw. Neugeborenenperiode meistens als nekrotischer oder apoptotischer Zelltod (Felderhoff-Mueser et al., 2000; Taylor et al., 1999). Neuere Studien sowohl im Tiermodell (Li et al., 1995; MacManus et al., 1993; Mehmet et al., 1994; Schulze-Osthoff et al., 1998), als auch bei Neugeborenen (Bruck et al., 1996; Taylor et al., 1999) zeigen, dass ein signifikanter Anteil des neuronalen, hypoxisch/ischämischen Zelltodes der Apoptose zugerechnet werden kann.

1.2.1 Nekrose

Nekrotischer Zelltod ist meist Folge von extremer Zellschädigung und wird im Unterschied zur Apoptose nicht transkriptionell kontrolliert. Charakterisiert ist die Nekrose durch einen Verlust der Plasmamembranintegrität, gefolgt von einer Enzymfreisetzung und unspezifischer DNA-Degradierung (Friedman und Haddad, 1993; Walker et al., 1988).

Beim nekrotischen Zelltod aktiviert die Hypoxie/Ischämie eine Kaskade von biochemischen Mechanismen, welche zur Störung der zellulären Funktionen führen (Abb.1). Durch die

Hypoxieexposition kommt es innerhalb von Minuten zu einem Mangel an ATP im zerebralen Kortex (Berger et al., 1992) und die Na^+/K^+ -Pumpe schränkt ihre Funktion ein. Der Ionengradient der Zellmembran kann nicht mehr aufrecht erhalten werden. Es kommt zum Einstrom von Na^+ und zu einer Depolarisation der Zellmembran. Dies wiederum führt zum zellulären Ca^{2+} -Einstrom über die neuronale Zellmembran und aus den Mitochondrien. Die Depolarisation ist abhängig von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und der Freisetzung von Neurotransmittern. Besonders Asphyxie stimuliert den Ca^{2+} -Einstrom und die Freisetzung von exzitatorischen Neurotransmittern. Der erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt löst verschiedene Mechanismen aus: Aktivierung von Proteasen, Lipasen, Phospholipasen und Freisetzung von freien Radikalen, die alle eine erhöhte Zellmembranpermeabilität bedingen und den Zelltod zur Folge haben können (Lutz, 1992; Siesjo, 1988; Silverstein et al., 1983).

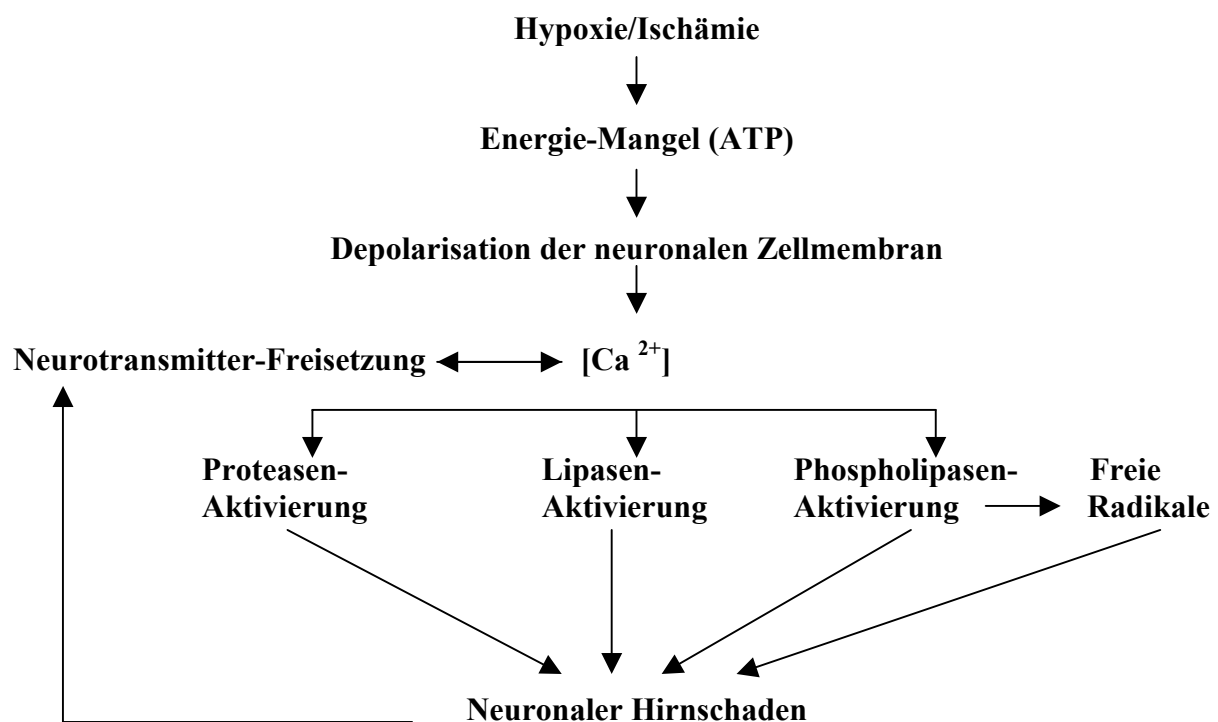


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Folgen einer perinatalen Hypoxie/Ischämie. Kaskade von biochemischen Mechanismen, welche zur Störung der zellulären Funktion oder zum Zelltod führen (Chen, 1997, modifiziert).

1.2.2 Apoptose

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist entscheidend für das Gleichgewicht in Geweben multizellulärer Organismen. Er spielt eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen,

besonders im Immunsystem, im Nervensystem und in der Entwicklung von Geweben (Krammer, 1999; Vaux und Korsmeyer, 1999). Die Apoptose ist eine transkriptionell kontrollierte, zelluläre Antwort auf moderate Zellschädigung oder verschiedene Zytokine (Ishimaru et al., 1999; Lu und Lane, 1993).

Apoptose kann durch viele verschiedene Stimuli induziert werden: Wachstumsfaktorentzug, UV- oder Gammastrahlen, Chemotherapeutika oder durch die Familie der transmembranösen Proteine, die Zelltodrezeptoren (Sartorius et al., 2001). Die wachsende Familie der Zelltodrezeptoren ist Teil der TNF- (Tumor nekrose factor)/NGF- (nerve growth factor) Rezeptoren Superfamilie. Die Todesrezeptoren sind charakterisiert durch eine intrazelluläre death domain, welche für das apoptotische Signal entscheidend ist (Sartorius et al., 2001). Von diesen Zelltodrezeptoren sind sechs bekannt: TNF-R1, CD95 (APO-1 oder FAS), DR3, Trainl-R1, Trail-R2 und DR6 (Schulze-Osthoff et al., 1998). Diese Zelltodrezeptoren werden durch ihre natürlichen Zelltod-Liganden (TNF-Familie) aktiviert.

Während der Apoptose wird Cytochrome c aus den Mitochondrien freigesetzt und interagiert mit Apaf-1 und Caspase-9, die die Caspase-Kaskade aktivieren (Li et al., 1997; Liu et al., 1996; Slee et al., 1999). In apoptotischen Zellen verändert sich die chemische Struktur der Plasmamembran, die Membran selbst aber bleibt intakt (Fadok et al., 1992). Endonukleasen zerschneiden die genomische DNA in DNA-Oligomere von ca. 180 Basenpaaren (Walker et al., 1988).

Es werden eine Reihe zeitlich aufeinander folgende Ereignisse angenommen, die dem apoptotischen Zelltod vorausgehen. Dirnagl et al. (1999) beschreibt eine Kaskade, in der Minuten nach einem hypoxisch/ischämischen Ereignis eine Exitotoxizität auftritt, die von einer Depolarisierung im Perinfarkt-Gebiet gefolgt wird. Nach Stunden kommt es zur Inflammation und erst nach Tagen zur Apoptose.

1.2.3 Neuropathologische Formen der hypoxisch/ischämischen ZNS-Schädigung

Es werden neuropathologisch verschiedene Formen der ZNS-Schädigung unterschieden: Der selektive neuronale Zelltod (Friede, 1989; Laroche, 1977; Norman, 1978; Volpe, 1995) und der Status marmoratus, der nur in 5 % der Fälle von Neugeborenen mit hypoxisch/ischämischer Hirnschädigung auftritt (Friede, 1989; Rorke, 1992). Von parasagittaler zerebraler Hirnschädigung wird meistens bei reifen Neonaten berichtet (Friede, 1989; Laroche, 1977; Norman, 1978; Volpe, 1995). Periventrikuläre Leukomalazie (Laroche, 1977) (Norman, 1978) kommt bei unreifen Neugeborenen vor. Intra- und periventrikuläre Hämorrhagien sind eine typische Läsion von unreifen Neugeborenen nach Hypoxie/Ischämie (Volpe, 1995). Sie treten in der germinalen Matrix des Gehirns auf, einer Region, die in der Entwicklung von Frühgeborenen

stufenweise kleiner wird und in reifen Neonaten fast komplett verschwindet (Hambleton und Wigglesworth, 1976; Moody et al., 1994; Nakamura et al., 1990). Die Blutgefäße dieser Region reißen leicht und führen zu einer intra- oder periventrikulären Hämorrhagie (Berger et al., 1997; Funato et al., 1992; Goldberg et al., 1980; Milligan, 1980). Fokale/multifokale ischämische Hirnschäden entstehen in Regionen, die nur durch ein zerebrales Gefäß versorgt werden. Die Häufigkeit dieses Hirnschadens steigt mit der Reife des Neonaten (Barmada et al., 1979). Diese Form der Hypoxie/Ischämie kommt häufig bei Infektionen, Traumata oder bei Zwillingen vor (Bejar et al., 1990; Scheller und Nelson, 1992; Walker et al., 1988).

1.2.4 Langzeitschädigung des ZNS durch Hypoxie/Ischämie

Langzeitschädigungen des ZNS müssen nicht immer mit dem Zelltod verbunden sein. Nach Hypoxie/Ischämie können Veränderungen des Phänotypus neuronaler Zellen im Sinne der Plastizität auftreten, die sich besonders in den Langzeitveränderungen zeigen (Soulier et al., 1997). Klinische, tierexperimentelle und zellbiologische Untersuchungen zeigen, dass das dopaminerge System des ZNS an der Entstehung dieser Langzeitveränderungen durch perinatale Hypoxie wesentlich beteiligt ist (Chen et al., 1997; Gross et al., 2000). Unter physiologischen Bedingungen spielt Dopamin eine wichtige Rolle in der Entwicklung des motorischen Systems und des emotionalen Verhaltens. Veränderungen im dopaminergen System, z.B. durch eine Asphyxie, äußern sich demzufolge in Verhaltensauffälligkeiten wie Lernschwierigkeiten oder einem hyperkinetischen Syndrom (Younkin, 1992). Eine perinatale Asphyxie wird auch als prädisponierender Faktor zur Ausbildung von Erkrankungen wie Schizophrenie, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson angesehen (Andersson et al., 1995).

1.3 Faktoren, die den Zelltod beeinflussen

1.3.1 Hypoxia inducible Factor 1

Hypoxie/Ischämie aktiviert nicht nur die Schädigungs-, sondern auch die Protektionsmechanismen der Zelle. Eine frühe Komponente in der Reaktion auf eine Hypoxie/Ischämie ist die Aktivierung von HIF-1 (hypoxia inducible factor 1), einem nukleären Protein, welches die Transkription verschiedener Enzymen induziert:

- Das Hormon Erythropoietin (EPO) (Goldberg et al., 1988; Beck et al., 1991; Semenza, 1998)
- Das Sauerstoff abhängige Gen VEGF (vascular endothelial growth factor) (Banai et al., 1994; Ikeda et al., 1995; Ladoux und Frelin, 1997; Levy et al., 1995)

- Die glykolytischen Enzyme Aldolase A, Enolase 1, Lactat Dehydrogenase A, Phosphofruktokinase L, Pyruvatkinase M und die Phosphoglyceratkinase 1 (Firth et al., 1995; Kress et al., 1998; Li et al., 1996; Semenza et al., 1994)
- Die induzierbare NO-Synthase (Melillo et al., 1995)
- Der Glucose-Transporter GLUT1 (O'Rourke et al., 1996)
- Das Eisentransportprotein Transferrin (Rolfs et al., 1997)
- Das vasokonstriktorisches wirkende Peptidhormon Endothelin 1 (Hu et al., 1998)

Wie man aus der Vielzahl der durch HIF-1 regulierten Prozesse erkennen kann, ist HIF-1 ein Schlüsselfaktor für die Regulierung der Anpassung von Zellen und Geweben an eine Hypoxie.

HIF-1 ist ein Heterodimer und besteht aus einer HIF-1 alpha Untereinheit (Jiang et al., 1996) und einer beta-Untereinheit (ARNT, ah receptor nuclear translocator) (Wang und Semenza, 1995), (Wang et al., 1995). Diese Polypeptide gehören beide der Familie der basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren mit PAS-domain-Proteinen an (Abb.2).

Unter hypoxischen Bedingungen dimerisieren die beiden Untereinheiten HIF-1 alpha und HIF-1 beta und bilden den HIF-1 Komplex, welcher an „hypoxia responsive elements“ (HRE) bindet, die bei vielen adaptiven Genen in der Promotorregion vorhanden sind.

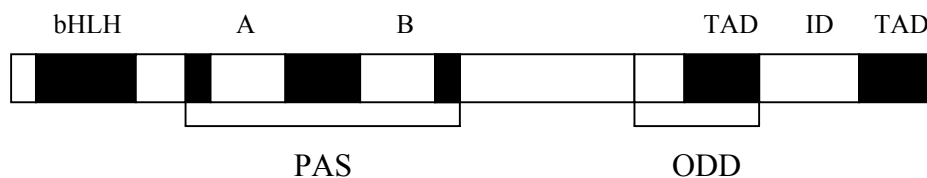


Abbildung 2: Struktur von HIF-1 alpha. Die Sequenz beginnt mit der Helix-Loop-Helix (bHLH). Anschließend folgt die PAS Domäne mit den zwei hydrophoben repetitiven Sequenzen, die als Untereinheiten A und B bezeichnet werden. Im C-Terminus liegen zwei Transaktivierungsdomänen (TAD), die durch eine inhibitorische Domäne (ID) voneinander getrennt sind, und die sauerstoffabhängige Degradationsdomäne (ODD), die mit einer der Transaktivierungsdomänen und einem Teil der inhibitorischen Domäne überlappt (Stein, 2000).

Diese Polypeptide wurden in fast allen Geweben, sowohl in Nagetieren, als auch in menschlichem Gewebe gefunden. Auch Tumorzellen produzieren HIF-1 (Kress et al., 1998). Sowohl HIF-1 beta (ARNT), als auch HIF-1 alpha werden kontinuierlich gebildet. Der HIF-1 alpha Gehalt wird über den Abbau im Ubiquitin-Proteasom-System reguliert (Salceda und Caro, 1997). Unter hypoxischen Bedingungen wird das Ubiquitin-Proteasom-System gehemmt und der schnelle Anstieg des HIF-1 alpha erlaubt eine schnelle Adaptation an die Hypoxie.

1.3.2 Nervenwachstumsfaktor

Der Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor, NGF) ist ein Protein mit zwei identischen Ketten von 118–120 Aminosäuren, welches in allen von sympathischen Neuronen innervierten Geweben produziert wird. NGF wird als Vorprotein intrazellulär generiert und zum fertigen Protein gespalten. Dieses Protein vermittelt seine biologische Aktivität über den $p75^{\text{NTR}}$ Neurotrophin Rezeptor, der unselektiv alle Neurotrophine, ähnlich dem Tyrosinkinase Rezeptor, bindet (Chao und Bothwell, 2002). NGF ist notwendig für das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von sympathischen und sensorischen Neuronen des peripheren Nervensystems und für die cholinergen Neuronen des ZNS (Levi-Montalcini und Angeletti, 1968; Levi-Montalcini, 1976; Johnson et al., 1986). Neuronen, denen NGF fehlt, sterben den apoptotischen Zelltod (Oppenheim, 1991).

1.3.2.1 Nervenwachstumsfaktor und der Zelltod

Die in der Entwicklung des Gehirns physiologische Apoptose kann direkt durch NGF vermittelt sein. NGF bindet und aktiviert den Neurotrophin Rezeptor $p75$ ($p75^{\text{NTR}}$), über den Neuronen apoptotisch werden. Die apoptotische oder anti-apoptotische Wirkung von NGF scheint davon abzuhängen, ob an der Zielzelle der Rezeptor $p75$ allein oder zusammen mit dem trkA Rezeptor (tyrosinkinase rezeptor) exprimiert wird. Bei Expression beider Rezeptoren findet kein apoptotischer Zelltod statt (Frade und Barde, 1998).

Neuerdings wurde gezeigt, dass das Proneurotrophin des NGF eine höhere Affinität als das reife NGF zum $p75^{\text{NTR}}$ Neurotrophin Rezeptor hat (Lee et al., 2001). Reifes NGF hat eine höhere Affinität zum Tyrosinkinase-Rezeptor Trk. Eine Bindung des ProNGF an $p75^{\text{NTR}}$ führt zur Apoptose, wohingegen reifes NGF mit hoher Affinität zum Trk Rezeptor das Überleben der Zellen fördert (Lee et al., 2001). Auch kommerzielles NGF beinhaltet kleine Mengen von ProNGF (Reinshagen et al., 2000).

Die Vulnerabilität der mit NGF behandelten PC12-Zellen unterscheidet sich stark von der unbehandelten Zellen. Es wurde gezeigt, dass Zyanid in NGF-behandelten, differenzierten PC12-Zellen, im Gegensatz zu undifferenzierten PC12-Zellen, Apoptose induziert (Mills et al., 1996).

1.3.2.2 Nervenwachstumsfaktor und die Zellprotektion

NGF wirkt unter bestimmten Bedingungen zellprotektiv. Es verringert bei PC12-Zellen die Empfindlichkeit gegenüber Hypoxie und Glucosedepprivation (Boniece und Wagner, 1993; Boniece und Wagner, 1995). Die Neuroprotektion von NGF wird vermutlich durch einen NGF-

induzierten Anstieg von bcl-2 vermittelt, einem anti-apoptotischen Protein, welches bei Serumentzug den apoptotischen Zelltod verhindert (Kato et al., 1996). Tiere, die mit Antikörpern gegen NGF behandelt wurden, zeigen eine Zunahme des programmierten Zelltods im Vergleich zu unbehandelten (Blochl und Thoenen, 1996; Lindholm et al., 1993).

Therapeutische Ansätze versuchen diese Neuroprotektion zu nutzen. Nachträgliche Injektion von NGF bei sich differenzierenden hypoxischen Neuronen vermindert den Zelltod. Holtzman et al. (1996) zeigte dies an unreifen Rattenhirnen, bei denen NGF das neonatale Gehirn gegen hypoxisch-ischämische Schäden schützte.

1.3.3 Einfluss von Temperatur auf den Zelltod

Hypothermie hat einen protektiven Einfluss auf die Hypoxie/Ischämie-induzierte Zellschädigung. Schon in den 50er Jahren wurde demonstriert, dass schnelles Kühlen bei asphyktischen Neugeborenen durch Verbesserung des Gleichgewichtes zwischen zerebralem Sauerstoffverbrauch und -angebot das Überleben verlängert (Miller et al., 1964; Westin et al., 1959; Westin et al., 1962). In zahlreichen neonatalen Tierversuchen wurde eine lang anhaltende neuroprotektive Wirkung bei einer geringen Verminderung der Temperatur des Cerebrums nach Hypoxie/Ischämie gezeigt (Thoresen und Wyatt, 1997). Weiter wurde gezeigt, dass Hypothermie das „therapeutische Fenster“ nach einer akuten Hypoxie/Ischämie verlängert und einen synergistischen Effekt mit anderen Therapieformen hat (Green et al., 1995).

Durch eine verringerte Körpertemperatur sinkt der Bedarf an Sauerstoff und Glukose. Adaptativ wird die neuronale Aktivität durch inhibitorische Neuromodulatoren wie Gamma-amino-butyric-acid (GABA) vermindert und der Sauerstoff- und Glukosebedarf reduziert (Nilsson und Lutz, 1991). Auch besteht ein Zusammenhang zwischen Hypothermie und einer Verminderung neuronaler Aktivität (Yakimov K et al., 1996).

Eine Anhebung der Gehirntemperatur bewirkt, im Gegensatz zur Hypothermie, eine vermehrte Empfindlichkeit für hypoxisch/ischämischen Hirnschaden (Busto et al., 1987). Neuere Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen mütterlichem Fieber $>38^{\circ}\text{C}$ und einem 9-fach erhöhten Risiko von spastischer zerebraler Lähmung (Grether und Nelson, 1997). Die dabei erhöhte fetale Temperatur könnte mit einer erhöhten Vulnerabilität des neuronalen Gewebes assoziiert sein (Wyatt und Thoresen, 1997).

1.4 Experimentelle Modelle in der Hypoxieforschung

1.4.1 PC12-Zellen als Modell für neuronale Zellen

Für die Untersuchung der Mechanismen des Zelltodes unter Hypoxie/Ischämie werden häufig zelluläre Modelle verwendet, da diese die Möglichkeit bieten, die Versuchsbedingungen eindeutig zu definieren. Ein oft benutztes Modell sind PC12-Zellen. PC12-Zellen stammen von einer Phäochromozytom Zelllinie der Ratte ab (Greene und Tischler, 1976). In Suspension wachsend, sind diese Zellen eine Tumorzelllinie. Auf Kollagen wachsen PC12-Zellen adhärent und bilden kleine Neurite aus. Durch Zugabe von NGF ändern die auf Kollagen gewachsenen PC12-Zellen ihren Phänotyp von proliferierenden in post-mitotische neuritische Zellen (Greene und Tischler, 1976). Der neuronale Charakter von NGF-behandelten PC12-Zellen wurde anhand von neu gebildeten funktionellen cholinergischen Synapsen mit Myotuben von einer klonalen Rattenmuskelzelle gezeigt (Futamura et al., 1995). PC12-Zellen benötigen nach NGF-Behandlung zum Überleben weiterhin NGF (Mesner et al., 1992). Werden PC12-Suspensionszellen mit NGF behandelt (priming), behalten sie morphologisch ihre Struktur bei und es erfolgt weder eine Neuritenbildung noch eine Differenzierung.

1.4.2 Antisense HIF-1 alpha

In Bakterienzellen existiert ein Mechanismus translationaler Kontrolle der Genexpression. Dieser wird durch eine Antisense-RNA vermittelt, deren Sequenz komplementär zu dem Bereich einer mRNA ist, welches das Initiationscodon enthält. Die Hybridisierung der komplementären Antisense-RNA blockiert die Erkennung des Initiationscodons, so dass kein Translationsstart erfolgt (Delihas et al., 1997). Neuerdings wurden auch natürliche Antisense-Mechanismen in humanen B-Lymphozyten und HEP2 Zellen (human epidermoid carcinoma cells) gefunden, die eine Expression von Genen vermindern (Chu und Dolnick, 2002; Hatzoglou et al., 2002). Thrash-Bingham und Tartof (1999) berichten sogar über eine natürliche HIF-1 alpha Antisense, die in Nierenkarzinomzellen vermehrt exprimiert wird.

Durch Vektoren ist es möglich experimentell die Genexpression in eukaryotischen Zellen zu hemmen. Die Vektoren produzieren große Mengen einer zum RNA-Transkript des Zielgens komplementären RNA. Die Repression der Genexpression beruht nicht auf der direkten Translationsinhibition, sondern auf einer Hybridisierung der Antisense-RNA an das Transkript des Zielgens und behindert dessen Reifung im Zellkern (Lodish, 2001).

Eine transgene PC12-Zelllinie, die mit Antisense HIF-1 alpha permanent transfiziert wurde, stellt eine weitere Möglichkeit dar, um die Rolle von HIF-1 für den Zelltod zu untersuchen. Die in der AG Prof. Gross entwickelten transgenen Zellen wurden für diese Untersuchungen herangezogen (Leclere, 2002).

1.4.3 Methoden der Zelltodmessung

Zur Analyse des Zelltodes kann man verschiedene Methoden heranziehen. Zur genaueren Differenzierung zwischen Nekrose und Apoptose benutzten wir die Durchflusszytometrie. Dabei fließt ein Strom von Zellen vor einem Laserstrahl, welcher Zellen, mit fluoreszierendem Antikörper, zur Fluoreszenz anregt. Es können verschiedene Zellarten auf Grund der unterschiedlichen Lichtstreuung oder durch das von den Zellen emittierte Fluoreszenzlicht unterschieden werden. Auf diese Weise ist es möglich, eine bestimmte Zellart innerhalb einer gemischten Zellsuspension zu erkennen. Mit dem fluoreszenzaktiven Zellsortierer kann aus Tausenden verschiedenartiger Zellen eine einzige Zelle aussortiert werden.

Mit einem Annexin-V Kit (Bender MedSystems, Wien, Österreich) und der Doppelfärbung mit Propidium-Jodid ist es möglich sowohl eine Aussage über die frühe und späte Apoptose, als auch über die Nekrose zu machen. Die Verlagerung von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Plasmamembran ist ein frühes Ereignis der Apoptose. Das Zelladhäsionsprotein Annexin-V bindet Calcium-abhängig an Phosphatidylserin (Walton et al., 1997). Ist es mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelt, kann man innerhalb von 20 Minuten Apoptose und Nekrose unterscheiden. Zur weiteren Analyse von zytoplasmatischen Schäden zogen wir die Messung der Laktat Dehydrogenase (LDH) im Medium heran. Sie ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, welches in allen Zellen vorhanden ist. Bei Zellmembranschäden tritt es aus und ist im Überstand des Zellkulturmediums zu messen. Des weiteren benutzten wir das Dehydrogenase-Kit „EZ4U“ (Biomedica, Wien, Österreich). Dabei werden Tetrazoliumsalze von vitalen Mitochondrien in intensiv gefärbte Formazanderivate umgewandelt. Da innerhalb weniger Minuten nach dem Absterben der Zelle die Mitochondrien inaktiv werden, eignet sich diese Messmethode zur Vitalitätsmessung.

1.4.4 Methoden der HIF-1 Bestimmung

Als Methode zur Bestimmung von HIF-1 kommen zyto- und histochemische Untersuchungen genauso in Frage wie molekularbiologische Untersuchungsmethoden. Auf der mRNA-Ebene kann man HIF-1 alpha mittels einer Reverse-Transkriptase-PCR sowohl quantitativ als auch qualitativ nachweisen. Um den Effekt von HIF-1 auf die Zielgene zu untersuchen und aufgrund

der Regulation der HIF-1-Aktivität durch Abbau von HIF-1 alpha über das Ubiquitin-Proteasom-System auf der postRNA-Ebene (Salceda und Caro, 1997), werden Methoden angewandt, die HIF-1 auf Proteinebene messen. Zur Messung des HIF-1 Proteins können Methoden wie der Western Blot, EMSA, ELISA und Reporterassays angewandt werden. In dieser Arbeit benutzen wir Reporterassays, um die HIF-1-Aktivität quantitativ und qualitativ messen zu können. Voraussetzungen für Reporterassays sind eine Transfizierbarkeit des verwendeten Zell-Modells und ein intakter Proteinsyntheseapparat.

Reporterassays erlauben eine Aussage über regulatorische Faktoren im Promotorbereich eines Gens. Regulierend wirken der Promotor selbst, Enhancer oder Transkriptionsfaktoren wie HIF-1. Zur Bestimmung der Genexpression von HIF-1 verwendeten wir das Reporterplasmid pGL3 (Promega, Mannheim) und einen auf diesem basierenden hypoxiesensiblen pHBE-Vektor, der von Kietzmann (Göttingen) zur Verfügung gestellt wurde (Kietzmann et al., 2001).

In die BglII-Schnittstelle des pGL3-Vektors wurde vor den SV40-Promotor (Simeon-Virus-40) eine 48 bp lange Sequenz inkloniert, die aus drei HIF-1 Bindungs-Elementen (HBE) besteht. Zur Kontrolle wurde eine singuläre EcoRI-Schnittstelle in das Konstrukt eingefügt.

Das Prinzip dieses Reporterplasmids beruht darauf, dass Sequenzen, die eine mögliche Enhancer-Funktion ausüben, die Aktivität des SV40-Promotors erhöhen und somit zu einer gesteigerten Expression des vom Promotor kontrollierten Genes führen. Als Reporter eignen sich Gene, die in der zu untersuchenden Zelle nur eine geringe eigene Aktivität aufweisen. Häufig verwendet werden Gene der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), der beta-Galaktosidase (beta-Gal), des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) und der Luciferase. Wir benutzen in den nachfolgenden Versuchen die „Firefly“-Luciferase, da die Messung ca. 20 mal sensitiver ist als die eines CAT-Systems. Beim Nachweis von HIF-1 alpha bindet das unter Hypoxie gebildete aktive Heterodimer aus ARNT und HIF-1 alpha an die HBE-Stellen und führt zu einer erhöhten Expression der Luciferase.

Als Kontrolle der HIF-1-Aktivitätsbestimmung mit pHBE wurden Schwesterkulturen mit dem Kontrollvektor pGL3 transfiziert. Die Abbildung 3 gibt die Struktur der beiden verwendeten Reporterplasmide wieder.

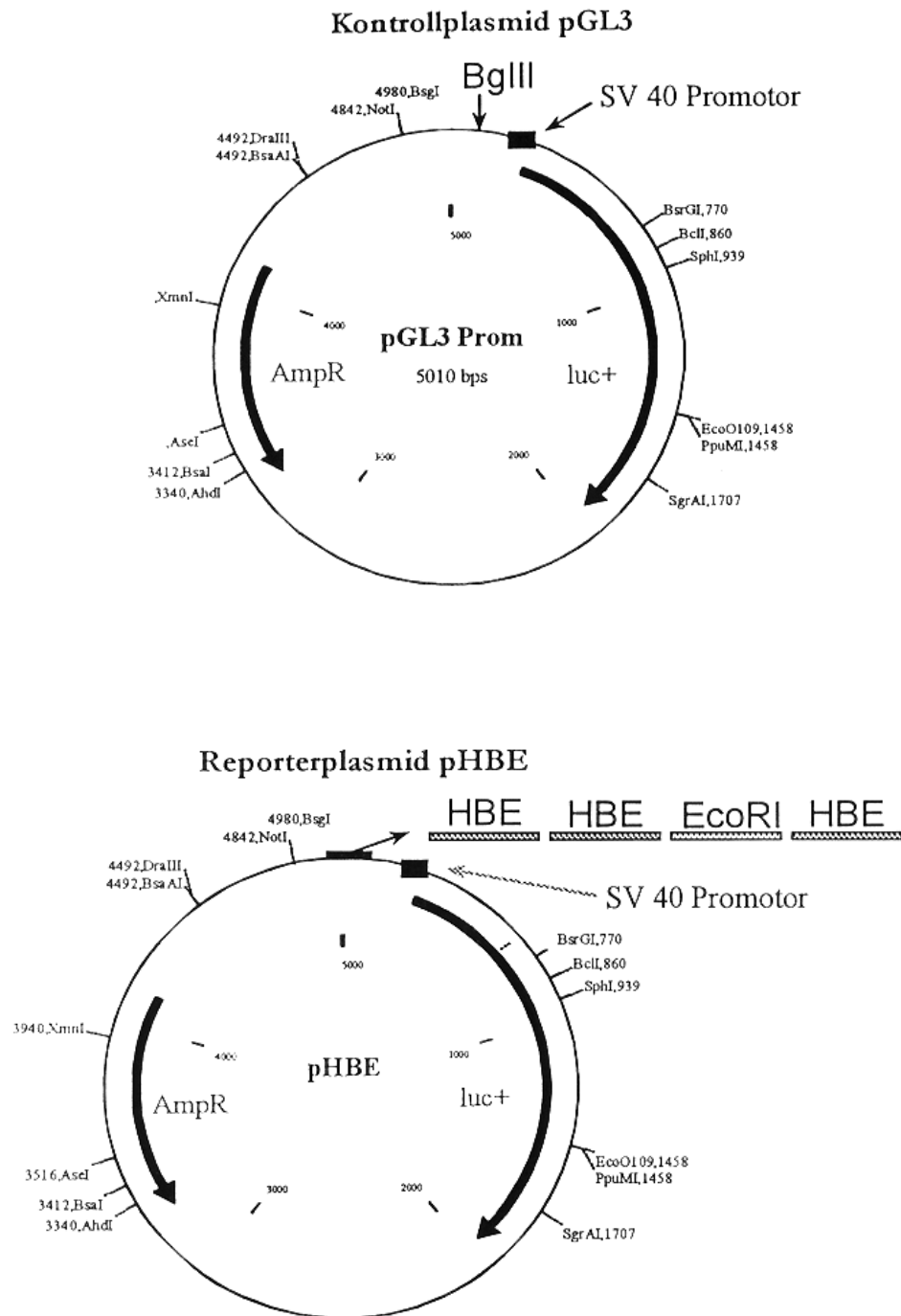


Abbildung 3: Kontrollplasmid pGL3 und der Hypoxie sensitive Vektor pHBE. Im Enhancerbereich des SV40 Promotors sind drei HIF-1 Bindungsstellen einkloniert. Durch Bindung des HIF-1 an die HBE (HIF Binding Element)-Stellen wird die Luciferase luc+ vermehrt exprimiert (Leclerc, 2002).

Häufig verwendete Methoden zum Einschleusen von Plasmiden in die Zelle sind die Elektroporation von Zellen, die DEAE-Dextran-Technik, die Kalziumphosphat-Kopräzipitation und die Lipidtransfektion.

Die Kalzium-Phosphat-Transfektion basiert auf der Methode der Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation von DNS und Kalzium-Phosphat-Kristallen. Aus Vorversuchen ergab sich, dass eine lipidvermittelte Transfektion von PC12-Zellen effektiver ist, so dass wir in den nachfolgenden Versuchen das Lipidtransfektionsreagenz Transfast (Promega, Mannheim) verwendeten. Es besteht aus einem synthetischen kationischen Lipid und einem neutralen Lipid (DOPE) (Abbildung 4).

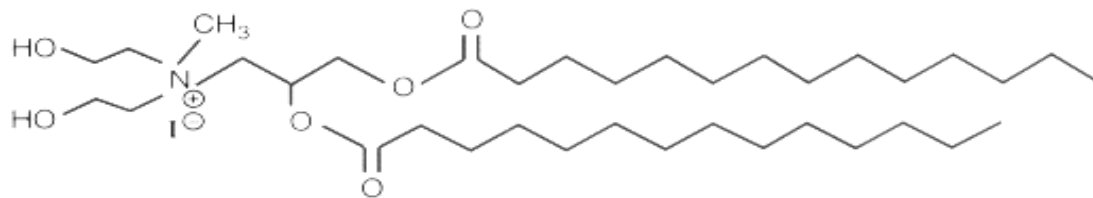


Abbildung 4: Transfektionsreagenz TransFast (Promega, Mannheim)

2 Problemstellung

Klinische, tierexperimentelle und zellbiologische Untersuchungen zeigen, dass der Zelltod neuronaler Zellen an der Entstehung von Kurz- und Langzeitveränderungen perinataler Hypoxie wesentlich beteiligt ist. Zur Aufklärung des Mechanismus der Schädigung neuronaler Zellen durch Hypoxie/Ischämie können Untersuchungen an experimentellen Modellen wesentlich beitragen.

Ein Schlüsselfaktor für die Regulation der Anpassung von Zellen und Geweben an eine Hypoxie/Ischämie ist der hypoxia inducible factor, HIF-1. Dieser Faktor reguliert nicht nur die Genexpression einer Reihe von Genen, sondern auch Faktoren, die die Hypoxie/Ischämie induzierte Apoptose beeinflussen.

Ziel der Arbeit ist, die Beziehung zwischen Hypoxie, HIF-1-Aktivität und Zelltod am Modell von PC12-Zellen zu untersuchen. PC12-Zellen zeichnen sich durch eine Reihe von Besonderheiten aus, die diese Zellen für die Beantwortung der Fragestellung gut geeignet erscheinen lassen. Die in Suspension wachsenden, undifferenzierten PC12-Zellen repräsentieren Zellen mit unbegrenztem Teilungsvermögen. Werden PC12-Zellen auf eine mit Kollagen beschichteten Oberfläche ausgesät und werden diese Zellen mit NGF behandelt, verändert sich ihre Form, die Proliferationsrate wird reduziert und die Zellen nehmen Eigenschaften von Neuronen an. Differenzierte PC12-Zellen werden als Modell für neuronale Zellen angewandt. Werden dagegen PC12-Suspensionszellen mit NGF behandelt (priming), behalten sie morphologisch ihre Struktur und es erfolgt keine Neuritenbildung und keine Differenzierung. Durch die Zugabe von NGF kann der Zeitpunkt des Beginns der Differenzierung der Zellen eindeutig bestimmt werden.

Somit stehen für die Untersuchungen vier Phänotypen zur Verfügung: Suspensionszellen (SUS), Suspensionszellen, die mit NGF behandelt wurden (SUS-NGF), adhären auf Kollagen- (KOLL-AD) und adhären auf Kollagen und mit NGF-behandelte Zellen (KOLL-AD-NGF).

Um die Beziehung zwischen Hypoxie, HIF-1-Aktivität und Zelltod zu untersuchen, wählten wir Bedingungen, die den Zelltod der Zellen veränderten und untersuchten parallel dazu die HIF-1-Aktivität. Inwiefern HIF-1 direkt Einfluss auf die Apoptose hat und wie NGF die HIF-1-Aktivität beeinflusst, ist nicht bekannt. Der Vergleich der Phänotypen kann Aufschluss über diese Beziehung und einen eventuellen Zusammenhang zwischen HIF-1-Aktivität und Zelltod liefern.

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Rolle von HIF-1 für den Zelltod, ist die Analyse von transgenen PC12-Zelllinien, die mit Antisense HIF-1 alpha permanent transfiziert wurden.

Ein wichtiger Faktor, welcher die Lebensdauer von Zellen beeinflusst, ist die Temperatur. Bekannt ist, dass Hypothermie protektiv gegenüber Hypoxie/Ischämie wirkt und Hyperthermie Zellen stärker schädigt. Wie die HIF-1-Aktivität von der Temperatur beeinflusst wird ist hingegen unbekannt.

Folgende Kriterien wurden zur Beurteilung des Zelltodes gewählt: Die LDH-Aktivität im Medium und die DH-Aktivität der Zellen als globale Indikatoren des Zelltodes. Zur Bestimmung der Art des Zelltodes, Apoptose oder Nekrose, wählten wir die Durchflusszytometrie. Die HIF-1-Aktivität wurde mit einem Hypoxie-empfindlichen Reportergen gemessen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die aufgelisteten Materialien, Medien, Reagenzien, Plasmide und kommerziell erworbenen Kits wurden in der Arbeit benutzt. Alle entsprachen dem Reinheitsgrad p.a. und wurden entweder selbst erstellt oder von folgenden Firmen bezogen:

ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, MA, USA), Bender MedSystem (Wien, Österreich), Biochrom Seromed (Berlin, Deutschland), Biomedica (Wien, Österreich), Corning-Costar (Bodenheim, Deutschland), Clonetechn (Palo Alto, USA), Falcon-Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA), Promega (Madison, WI, USA), Roche (Penzberg, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Stratagen (La Jolla, USA).

3.1.1 Zellkulturgefäße

50 ml Reaktionsgefäße, Falcon-Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)

10 ml Reaktionsgefäße (2059 Polypropylen Gefäße), Falcon

Zellkulturflaschen mit 25 cm² und 75 cm² Wachstumsfläche, Falcon

Mikrotiterplatten mit 6-, 24- und 96-Kavitäten, Zellkulturflaschen mit 25 cm² und 75 cm² Wachstumsfläche, Corning-Costar (Bodenheim, Deutschland)

Zellkulturplatten mit 48 Kavitäten, Corning-Costar

3.1.2 Seren

Pferde-Serum, hitzeinaktiviert, Biochrom Seromed (Berlin, Deutschland)

Fetale Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert, Biochrom Seromed (Berlin, Deutschland)

3.1.3 Zellkulturmedien

RPMI 1640, 2 g NaHCO₃ pro Liter, ohne L-Glutamin mit 10% Pferdeserum und 5% fetales Kälberserum.

3.1.4 Wachstumsfaktoren

Humanes rekombinantes NGF, Roche (Penzberg, Deutschland)

Kollagen S, Typ 1, Roche (Typ 1, Roche, Mannheim, Deutschland)

3.1.5 Antibiotika

G418 Sulfat, Geneticindisulfat, Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)

3.1.6 Puffer

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit NaOH oder HCl.

1X Coll Culture Lysis Reagent (CCLR):

- 25 mM Tris-Phosphat (pH 7,8)
- 2 mM DTT
- 2 mM 1,2-diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
- 10% Glycerol
- 1% Triton® X-100

BSG:

- 116 mM NaCl
- 27,2 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O
- 6,1 mM KH₂PO₄
- 2 g Glukose

PBS:

- 2,7 mM KCl
- 137 mM NaCl
- 1,5 mM KH₂PO₄
- 7,75 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O

3.1.7 Substratlösung für photometrische Detektion

50 mg ABTS, Roche (Mannheim, Deutschland)

50 ml Substrat-Puffer, Roche (Mannheim, Deutschland)

3.1.8 Plasmide

pGL3, Promega

pHBE, auf pGL3 basierendes Konstrukt (Kietzmann et al., 2001)

pGFP, Clontech, (Palo Alto, USA)

pCMV, Stratagene (La Jolla, USA)

p19P, ein auf pCMV basierendes Plasmid mit eine HIF-1 alpha Antisense-Konstrukt

3.1.9 Kommerzielle Kits

Lipid Transfektion mit Transfast, Promega (Mannheim, Deutschland)

„EZ4U“ (Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest), Biomedica (Wien, Österreich)

Cytotoxicity Detection Kit, LDH, Roche (Mannheim, Deutschland)

Annexin-V FITC Kit, Bender MedSystem (Wien, Österreich)

3.2 Methoden

Die folgenden Methoden wurden für diese Arbeit verwendet:

3.2.1 PC12-Zellen

PC12-Zellen sind Abkömmlinge einer Phäochromozytom Tumorzelllinie (von der Ratte) und wurden von der „American Type Culture Collection“ käuflich erworben. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10% Pferdeserum und 5% fetalem Kälberserum bei 37°C in einem mit 5% CO₂ (AGA Gas GmbH, Bottrop, Deutschland) begasten Inkubator (Billups-Rothenburg, Del Mar, USA). Die in Suspension wachsenden Zellen wurden zwei mal pro Woche in 250 ml (T75) Kulturflaschen (Falcon) passagiert. Die Aussaatdichte für die Vermehrung betrug 500000 Zellen pro ml.

3.2.2 Kulturbedingungen

Für Vergleichsuntersuchungen an adhärent wachsenden Zellen wurden PC12-Zellen auf mit Kollagen (Roche, Mannheim, Deutschland) beschichtete Zellkulturplatten (Falcon 3047, Becton Dickinson, New Jersey, USA und Costar 3548, Coening, New York, USA) ausgesät. Zum Beschichten der Zellkulturplatte wurde Kollagen (Kollagen S, Roche, Penzberg, Deutschland) (0,03 mg/ml destilliertes Wasser, 30 min Einwirkungszeit) benutzt.

Für die NGF-Versuche der adhärent wachsenden PC12-Zellen erfolgte eine einmalige Zugabe von humanem rekombinantem NGF (Roche, Penzberg, Deutschland) mit einer Endkonzentration von 500 ng/ml unmittelbar nach der Aussaat. Unterschiedliche NGF-Konzentrationen sind in den jeweiligen Versuchsanordnungen angegeben.

3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die einzufrierenden PC12-Zellen wurden mit frischem Zellkulturmedium gewaschen und anschließend mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml in 90% FKS (Fetales Kälber Serum) und

10% DMSO (Dimethylsulfoxyd) aufgenommen. Eine Lagerung erfolgte in Cryo-Gefäßen für 48 Stunden bei -70°C . Endgültig wurden die PC12-Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Cryo-Gefäße in einem 37°C warmen Wasserbad schnell erwärmt (40-60 Sekunden) und gleich danach in vorgewärmtes, komplettes Zellkulturmedium überführt. DMSO Reste wurden durch einen ersten Mediumwechsel nach 24 Stunden entfernt.

3.2.4 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden ein Hämozytometer nach Neubauer (Jürgens, Hannover, Deutschland) und ein Olympus (Olympus Optical, Japan) Mikroskop benutzt. 10 μl der Zellsuspension wurden entnommen und mit 190 μl BSG versetzt, so dass nur noch einzelne Zellen in der Suspension vorhanden waren. Ausgezählt wurden jeweils 4 große Eckquadrate, jeweils einem Volumen von 0,1 μl entsprechend. Um die Zellzahl pro ml zu erhalten, wurde der Mittelwert der vier Einzelzählungen mit 200000 multipliziert. Bei der Zellzahlbestimmung wurden immer Doppelwerte durchgeführt. Bei adhärennten Zellen auf Kollagen wurden die Monolayer mit einer Pipette von den Kavitäten abgelöst. Dazu wurde das Zellkulturmedium benutzt. Durch diese Art der Zählung wurden keine Zellen zerstört und die Zellen im Überstand mit erfasst.

3.2.5 Hypoxie

Die Hypoxieexposition erfolgte in einer Inkubations-Kammer (Billups-Rothenburg, Del Mar, CA, USA). Die Zellkultur wurde in diese Kammer gestellt und kontinuierlich mit einem Gasgemisch von 5% CO_2 , 95% N_2 (AGA Gas GmbH, Bottrop, FRG) perfundiert. Nach 15 min mit einer Fließrate von 20 l/min resultierte in der Atmosphäre der Kammer ein pO_2 von 5-10 mm Hg Sauerstoff, der über 24 Stunden stabil blieb. Der Sauerstoffgehalt in dem Kulturmedium betrug ca. 15-20 mm Hg. Die Kammer wurde hermetisch verschlossen und in den gleichen Inkubator wie die Kontroll-Kultur (Normoxie) mit 37°C gestellt. Die Dauer der Hypoxieexposition variierte zwischen 24 und 72 Stunden und ist im entsprechenden Ergebnisteil angegeben.

3.2.6 Transfektion

Für die Transfektion benutzten wir das Transfektionsreagenz Transfast (Promega, Mannheim, Deutschland). Das Plasmid (pGL3 bzw. pHBE) wurde mit 100 μl vorgewärmtem Zellkulturmedium gemischt und anschließend die 2-fache Konzentration an Lipid (Transfast, synthetic cationic lipid, Promega, Mannheim, Deutschland) hinzugefügt, in einem

Eppendorfröhrchen gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden bei der Suspensionskultur 150000 Zellen dazugegeben. Die adhärenenten Zellen wurden mit der gleichen Konzentration an Plasmid und Lipid behandelt, jedoch fand die Transfektion im Well (24-well Zellkulturplatten) statt, nachdem das Medium vorher abgenommen wurde. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurden 400 µl komplettes Zellkulturmedium hinzugefügt und bis zur Analyse bei 37 °C weiter inkubiert.

3.2.7 Reporterplasmide

Zur Bestimmung der HIF-1-Aktivität verwendeten wir das Reporterplasmid pGL3 (Promega, Mannheim, Deutschland) und einen auf diesem Vektor basierenden hypoxie-sensiblen pHBE-Vektor, der von Kietzman (Göttingen) zur Verfügung gestellt wurde (Kietzmann et al., 2001).

3.2.8 HIF-1 Berechnung

Zur Bestimmung der HIF-1 Aktivierung wurden zwei Plasmide verwendet: Der pGL3-Vektor mit einem SV40-Promotor und dem Luciferase-Gen, und der Vektor pHBE, mit drei Hypoxie-bindenden Elementen (HBE), an denen HIF-1 binden kann. Somit folgt einer vermehrten Expression aufgrund einer HIF-1 Aktivierung äquivalent eine Erhöhung des Luciferase-Gehalts. Der Kontrollvektor pGL3 stellt die Expression des Plasmides unabhängig von der HIF-1-Aktivität dar.

Zur Berechnung der HIF-1-Aktivität wurde folgende Formel benutzt:

$$\frac{RLU - des - pHBE - Vektors}{RLU - des - pGL3 - Vektors}$$

3.2.9 Klonierung des Antisense-Konstruktes

Die Klonierung des Antisense-Konstruktes wurde von Norbert Leclere (Leclere, 2000) durchgeführt.

3.2.10 Messung der Luciferase

Die Messung der von den Reporterplasmiden produzierten Luciferase erfolgte mit einem Luminometer (Luminoscan, Labsystems, Helsinki, Finnland). Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit CCLR-Puffer (Cell Culture Lysis Reagent) lysiert. Das Lysat wurde entweder bis zur luminometrischen Messung bei -70°C asserviert oder kurz abzentrifugiert und der Überstand direkt für die Bestimmung im Luminometer verwendet.

Jeweils 50 µl Lysat wurden in eine Kavität einer Mikrotiterplatte pipettiert und das generierte Luciferase-Signal nach Injektion der Substratlösung (Luciferin, Promega, Madison, USA) luminometrisch bestimmt. Das Signal wurde dabei über einen Zeitraum von 20 Sekunden gemessen. Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.2.11 Laktat Dehydrogenase im Medium

Um eine Aussage über die Zellschädigung machen zu können, benutzten wir die Analyse der Laktatdehydrogenase im Medium in Form des Cytotoxicity Detection Kit (Roche, Mannheim, Deutschland). Laktat Dehydrogenase (LDH) ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, welches in allen eukaryotischen Zellen vorhanden ist. Bei Zellmembranschäden tritt es aus dem Zytosol aus und ist im Überstand des Zellkulturmediums zu messen. Für die Messung der LDH wurde das Zellmedium mit den Zellen direkt im Anschluss an die Hypoxie entnommen und anschließend zentrifugiert (80×g für 10 min, 4°C). Im Zellkulturüberstand erfolgt die Messung der Absorption im Mikrotiterplatten-Reader (SLT, Crailsheim, Deutschland).

3.2.12 Mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität

Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen benutzen wir den Tetrazolium-Reduktions-Test „EZ4U“ (Biomedica, Wien, Österreich), ein modifizierter XTT-Test (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5carboxanilide). Im Anschluss an die Hypoxie wurde 25 µl der Tetrazoliumsalz-Lösung zu 250 µl Zellkulturmedium hinzugefügt und bei 37°C zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Absorption im Mikrotiterplatten-Reader bei 492 nm gemessen (SLT, Crailsheim, Deutschland).

3.2.13 Durchflusszytometrie

Annexin-V hat eine hohe Affinität zu Phosphatidylserinen, die im Rahmen der neuronalen Apoptose von der inneren zur äußeren Oberfläche der Plasmamembran klappen (Walton et al. 1997). Zellen, die unter normoxischen Bedingungen wuchsen und Zellen, die mit 1 µM Staurosporin behandelt wurden (Apoptose induzierende Substanz), dienten als Kontrolle. Die Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen wuchsen, wurden am Ende der Hypoxie gewaschen und in Puffer (10mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) resuspendiert und für 10 min im Dunkeln mit Annexin-V FITC (1 µg/ml, Bender MedSystems, Wien, Österreich) inkubiert. Um zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden zu können, wurden die Zellen anschließend mit Propidium-Jodid-Lösung (4 µg/ml, Bender MedSystems, Wien, Österreich)

inkubiert und sofort danach im Durchflusszytometer analysiert. Propidium-Jodid färbt keine lebenden und früh-apoptotischen Zellen. Die FACS-Analyse (Fluorescence activated cell scanning) wurde an einem FacScan-Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt, welches einen 488 nm Argonlaser zur Messung verwendet. Aus technischen Gründen wurden einige Versuche mit dem Galaxy-FlowSystems von „DAKO“ analysiert und mit der FlowMax-Software ausgewertet.

3.2.13.1 Analyse und Auswertung der Durchflusszytometrie

Annexin-V und Propidium-Jodid Färbung wurde mit Cellquest-Software (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und „WIN MDI Flowcytometry analysis“ (Josef Trotter) analysiert. Veränderungen in der Fluoreszenz wurden berücksichtigt, indem man die Hintergrundfluoreszenz normoxischer Zellen subtrahierte. Kleine Zellen, die nicht die Kriterien für neuronale Zellen erfüllten, wurden extrahiert. Eine Diskriminierung von Annexin-V, Propidium-Jodid und doppeltgefärbten positiven Zellen war mittels Dotplot-Diagrammen mit der Annexin-V FITC Fluoreszenz auf der Ordinate und der Propidium-Jodid-Fluorescence auf der Abszisse möglich.

3.2.14 Statistische Analyse

Bei den Untersuchungen erfolgte die Analyse der Daten nach ANOVA. Zunächst wurden die Daten mit einem Ausreissertest nach Tietz (Tietz, 1986) auf Gruppenkonsistenz überprüft. Die Signifikanz wurde anhand des Sheffé-Tests mit dem Statistik-Programm Statistika (Statsoft) ermittelt. Als Signifikanzniveau wurde das 95%-Konfidenzniveau gewählt und somit alle p-Werte $\leq 0,05$ als signifikant angesehen. Die signifikanten Werte sind im Text durch die Symbole * oder # gekennzeichnet.

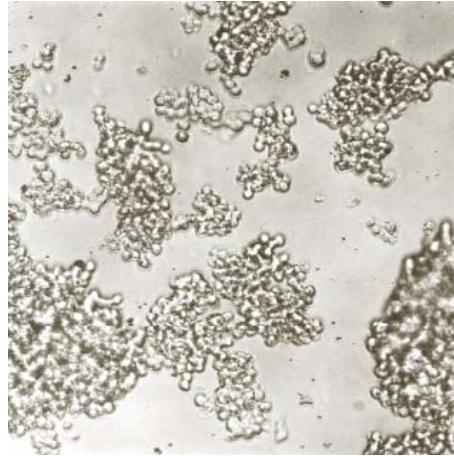
4 Ergebnisse

4.1 Versuchsaufbau

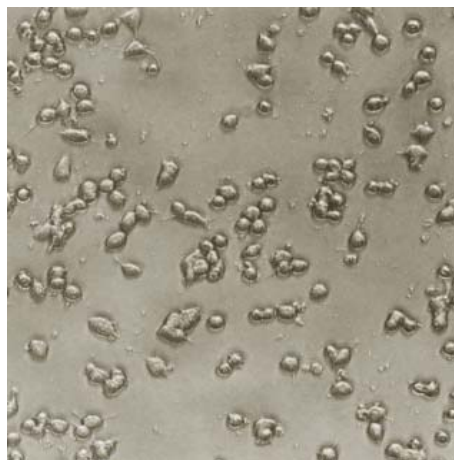
In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Phänotypen von PC12-Zellkulturen einer Hypoxie ausgesetzt: PC12-Zellen in Suspension (SUS), PC12-Zellen in Suspension, die mit NGF geprimt wurden (SUS-NGF), PC12-Zellen die adhären auf mit Kollagen beschichteten Plastikoberflächen wuchsen (KOLL-AD) und PC12-Zellen, die adhären auf mit Kollagen beschichteten Plastikoberflächen wuchsen und mit NGF behandelt wurden (KOLL-AD-NGF).

In Abbildung 5a) ist das morphologische Bild von PC12-Zellen in Suspension dargestellt. Suspensionszellen wachsen in Form von lockeren Aggregaten und haften nicht an der Kavitätenoberfläche. In Abbildung 5b) ist die Morphologie von PC12-Zellen, die adhären auf einer mit Kollagen beschichteten Oberfläche wachsen, dargestellt. Die Zellen wachsen adhären als Monolayer und bilden kleine Neurite. In Abbildung 5c) sind PC12-Zellen dargestellt, denen NGF zugesetzt wurde und die auf einer mit Kollagen behandelten Oberfläche wachsen. Sie wachsen als Monolayer und bilden Neuriten aus, die untereinander Kontakt aufnehmen.

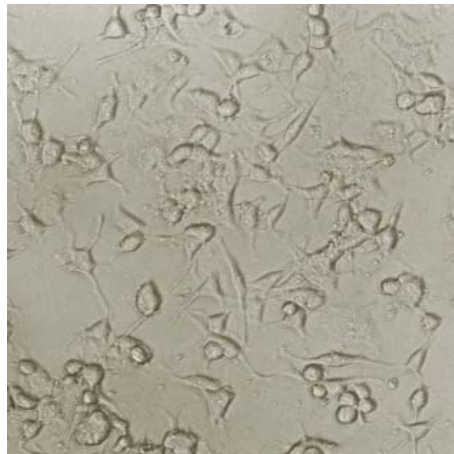
Der Versuchsablauf ist in Abbildung 6 dargestellt. Der Tag der Aussaat wurde als Tag 0 definiert. Die Transfektion erfolgte am Tag 2, unmittelbar vor der Hypoxieexposition. Die Dauer der Hypoxie variiert und ist in der jeweiligen Versuchsbeschreibung angegeben. Direkt nach der Hypoxieexposition wurden die Proben entnommen und mit den jeweiligen Methoden analysiert.



a)



b)



c)

Abbildung 5: PC12-Zellen am Tag 2 nach Aussaat in einer 24-Kavitätenplatte. a) Die Zellen wachsen in lockeren Aggregaten und haften nicht an der Kavitätenoberfläche (200-fache Vergrößerung). b) PC12-Zellen auf Kollagen. Die Zellen wachsen adhärent als Monolayer und fangen an kleine Neuriten zu bilden (400-fache Vergrößerung). c) PC12-Zellen auf Kollagen mit NGF. Die Zellen wachsen adhärent als Monolayer und bilden viele Neurite aus (400-fache Vergrößerung).

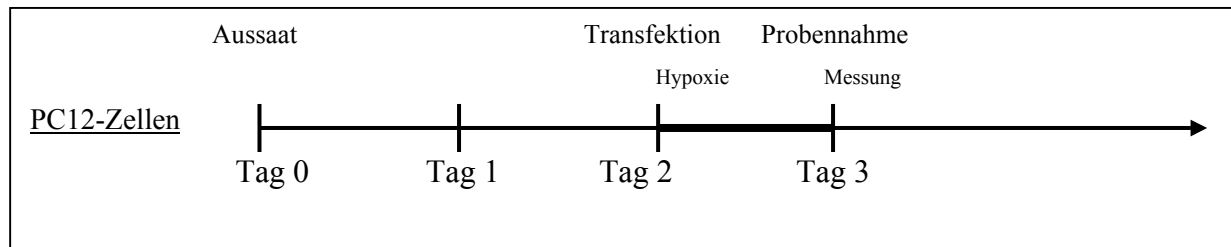


Abbildung 6: Versuchsablauf. Am Tag 0 wurden die Kulturen den jeweiligen Versuchsbedingungen ausgesetzt: SUS, SUS-NGF, KOLL-AD und KOLL-AD-NGF. Zu jedem Versuch wurde parallel eine Kontrollgruppe angesetzt, die sich lediglich durch die fehlende Hypoxieexposition unterschied.

4.2 Hypoxie und der Zelltod

4.2.1 LDH im Medium

Die Laktat-Dehydrogenase- (LDH) Aktivität im Medium gilt als ein allgemeiner Parameter für die Zellschädigung. Eine Erhöhung der LDH im Medium lässt entweder einen erhöhten Zelltod oder eine Erhöhung der Zellpermeabilität erkennen.

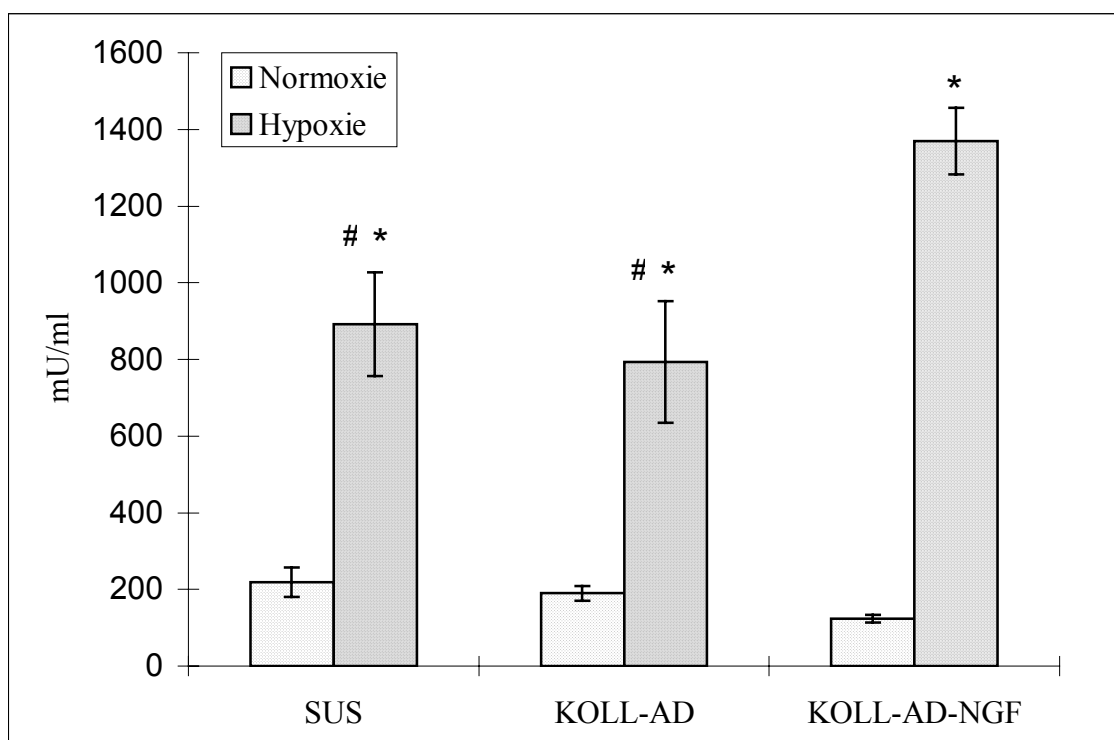


Abbildung 7: LDH-Aktivität im Medium nach 36 Stunden Hypoxie bei PC12-Zellen in Suspension (SUS), adhärennten Zellen auf Kollagen (KOLL-AD) und adhärennten Zellen mit NGF (KOLL-AD-NGF). Die Daten stellen die Mittelwerte \pm SEM dar. $n = 4$ unabhängige Versuche. Die LDH-Aktivität ist in mU/ml angegeben. * = $p < 0,01$ im Vergleich zu Normoxie. # = $p < 0,01$ im Vergleich zu KOLL-AD-NGF-Kultur.

In Normoxie besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Kulturen SUS, KOLL-AD und KOLL-AD-NGF (Abbildung 7). Nach einer Hypoxieexposition von 36 Stunden steigt bei allen

Zellkulturbedingungen die LDH-Aktivität im Medium an. Die LDH-Aktivität im Medium steigt bei den PC12-Zellen in Suspension (SUS), sowie bei adhärenen PC12-Zellen auf Kollagen (KOLL-AD) von Normoxie zur Hypoxie um ca. das 4-fache an. Bei den adhärenen PC12-Zellen auf Kollagen mit NGF (KOLL-AD-NGF) ist der Anstieg höher. Die LDH-Aktivität im Medium steigt von der Normoxie zur Hypoxie um ca. das 11-fache, ein Indikator dafür, dass adhärenente Zellen nach Zugabe von NGF hypoxievulnerabler sind.

4.2.2 Mitochondriale Dehydrogenaseaktivität

Als weitere Methode zur Beurteilung der Zellvitalität benutzen wir das Dehydrogenase-Kit „EZ4U“, um die mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität mittels Tetrazolium-Reduktionsverfahren zu bestimmen.

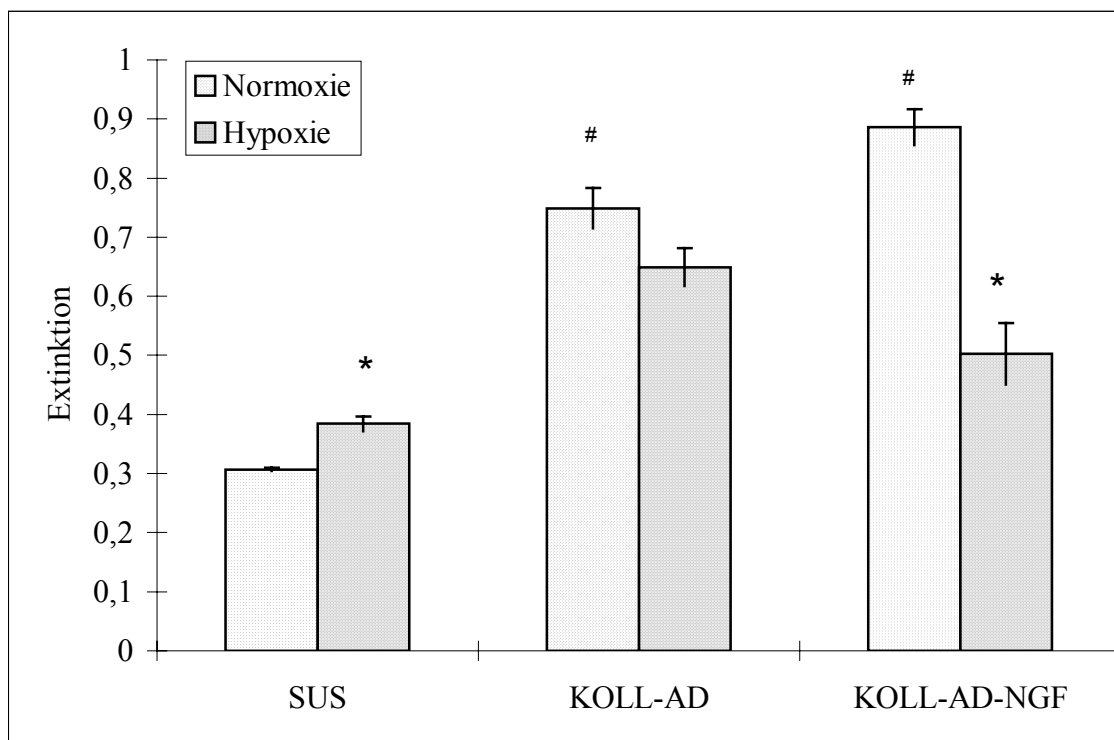


Abbildung 8: Dehydrogenase-Aktivität („EZ4U“) in Normoxie und nach 36 Stunden Hypoxieexposition bei PC12-Zellen in Suspension (SUS), adhärenen Zellen auf Kollagen (KOLL-AD) und adhärenen Zellen auf Kollagen mit NGF (KOLL-AD-NGF). Die dargestellten Daten sind Mittelwert \pm SEM. $n=8$ unabhängige Versuche. * = $p < 0,01$ im Vergleich zu Normoxie der jeweiligen Kultur. # = $p < 0,01$ im Vergleich zu Normoxie SUS.

Bei Normoxie erkennt man einen Unterschied zwischen den einzelnen Phänotypen. Die Dehydrogenase-Aktivität steigt im Vergleich zur SUS sowohl bei KOLL-AD, als auch bei KOLL-AD-NGF als Ausdruck eines veränderten Wachstums signifikant an. Ein Differenzierungsanreiz der PC12-Zellen durch Aussaat auf mit Kollagen beschichteten

Mikrotiterplatten und die Zugabe von NGF scheint die mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität zu aktivieren. Nach Hypoxieexposition erfolgt in der SUS-Kultur ein signifikanter Anstieg der Dehydrogenase-Aktivität im Vergleich zur Normoxie (Abbildung 8). Die Hypoxie wirkt hier aktivierend auf die Dehydrogenase-Aktivität. Adhärenzte PC12-Zellen, die auf mit Kollagen beschichteten Mikrotiterplatten wuchsen (KOLL-AD), zeigen keine signifikanten Veränderungen der Dehydrogenase-Aktivität durch die Hypoxieexposition. Bei den adhärenzten PC12-Zellen mit NGF (KOLL-AD-NGF) erkennt man einen deutlichen Abfall der Dehydrogenase-Aktivität nach der Hypoxieexposition. Die Extinktion sinkt, als Ausdruck der Zellschädigung, um ca. 40 % im Vergleich zur Normoxie.

4.2.3 Durchflusszytometrische Analyse

Um herauszufinden, ob die Hypoxieexposition den nekrotischen oder den apoptotischen Zelltod induziert, färbten wir die PC12-Zellen direkt nach Hypoxieexposition mit Annexin-V und Propidium-Jodid (PI) und analysierten sie im Durchflusszytometer. Drei verschiedene Gruppen von gefärbten Zellen wurden ausgewertet: Annexin-V positive (ANN+), Propidium-Jodid positive (PI+) und sowohl Annexin-V, als auch Propidium-Jodid positive Zellen (ANN+/PI+) (Banasiak et al., 1999).

Im Folgenden ist jeweils ein exemplarischer Versuch als Punktehistogramm dargestellt, anschließend erfolgt die Auswertung aller Versuche in Form eines Balkendiagramms (Mittelwert \pm SEM).

4.2.3.1 PC12-Zellen in Suspension

In der Normoxie befinden sich die meisten Zellen in einer großen Population als ungefärbte Zellen im unteren linken Quadranten. Wie in der Abbildung 9 dargestellt, kommt es nach einer Hypoxieexposition von 36 Stunden zu keinen Veränderungen. Undifferenzierte PC12-Zellen in Suspension (SUS) weisen eine hohe Resistenz gegenüber einer Hypoxieexposition auf.

Nach einer Hypoxieexposition von 72 Stunden erkennt man im Vergleich zur Normoxie bei den PC12-Zellen in Suspension (SUS) eine ANN+ Population im linken oberen Quadranten und eine ANN+/PI+ Population im rechten oberen Quadranten (Abbildung 10). Die Anzahl von PI+ Zellen ist gering.

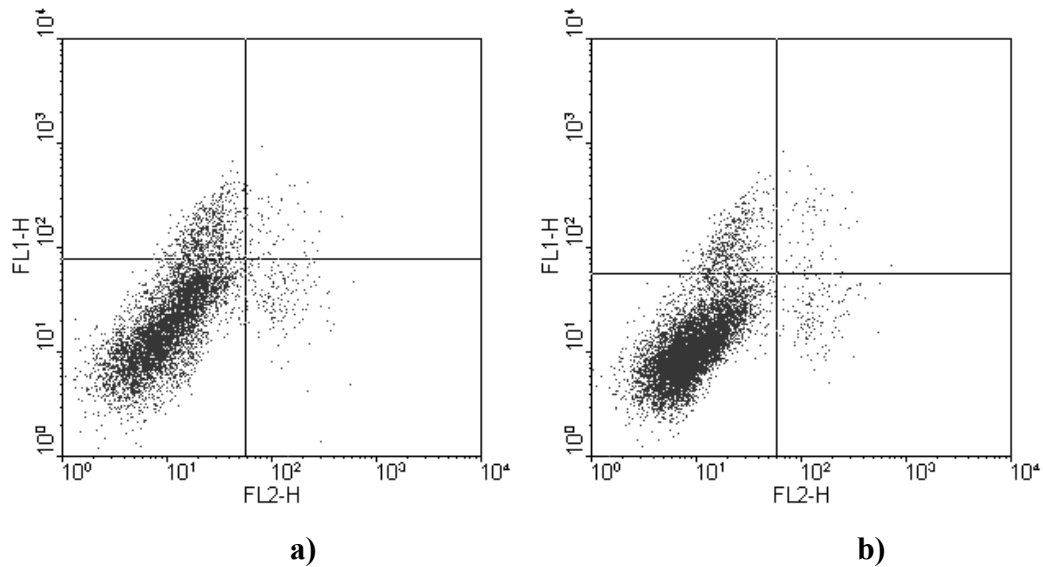


Abbildung 9: Punktehistogramm von PC12-Suspensionszellen. a) in Normoxie und b) nach 36 Stunden Hypoxie. Dargestellt ist ein exemplarischer Versuch mit einer Doppelfärbung mit Annexin-V und PI. FL1-H stellt die grüne Fluoreszenz (ANN) dar und FL2-H die rote Fluoreszenz (PI).

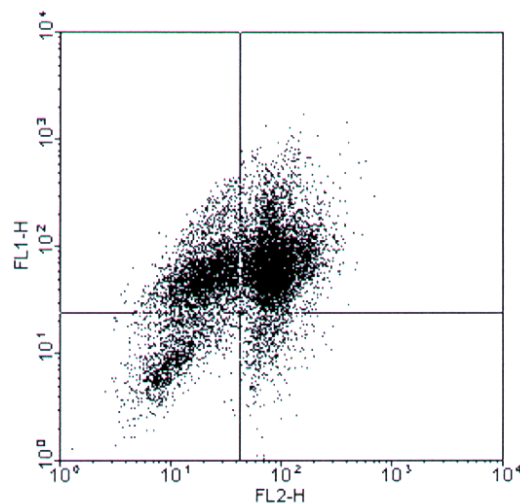


Abbildung 10: Punktehistogramm von PC12-Suspensionszellen nach 72 Stunden Hypoxie. Dargestellt ist ein exemplarischer Versuch mit einer Doppelfärbung mit Annexin-V und PI. FL1-H stellt die grüne Fluoreszenz (ANN) dar, FL2-H die rote Fluoreszenz (PI).

Wenn man die Versuche in einem Balkendiagramm darstellt (Abbildung 11), erkennt man, dass nach 72 Stunden Hypoxieexposition der prozentuale Anteil der ANN+ Zellen bis auf 30 % ansteigt. Der Anteil von PI+ Zellen bleibt von der Hypoxie unbeeinflusst. Am stärksten ist der Einfluss der Hypoxie auf den Anteil der ANN+/PI+ Zellen: Der prozentuale Anteil der ANN+/PI+ Zellen steigt bis auf 55 % an.

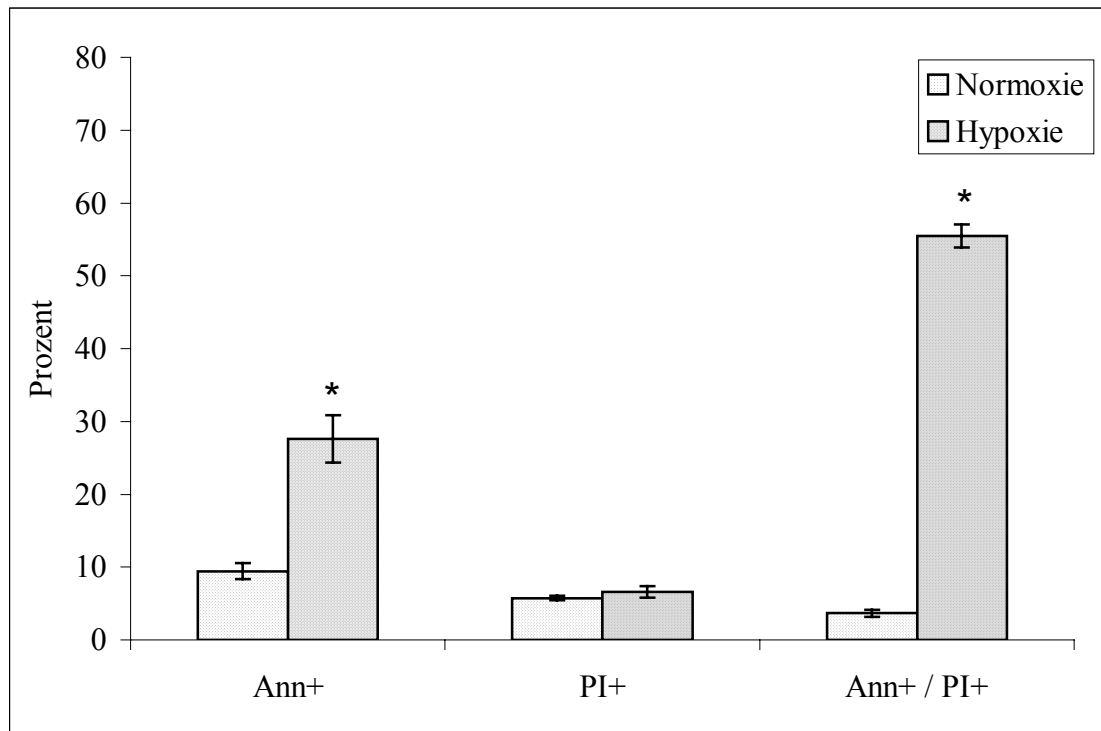


Abbildung 11: PC12-Zellen in Suspension in Normoxie und nach 72 Stunden Hypoxieexposition. Durchflusszytometrische Analyse mit Doppelfärbung von Propidium-Jodid (PI) und Annexin-V. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent. $n = 3$ unabhängige Versuche. * = $p < 0,01$.

4.2.3.2 PC12-Zellen in Suspension und mit NGF geprimt

Wie in Abbildung 12 im Punktehistogramm exemplarisch dargestellt, verhalten sich PC12-Zellen in Suspension anders, wenn sie mit NGF geprimt werden. Im Vergleich zur Normoxie a) sind nach einer Hypoxieexposition von 36 Stunden b) im oberen rechten Quadranten ein Anteil von etwa 14 % ANN+/PI+ Zellen, und im oberen linken ein Anteil von etwa 15 % ANN+ Zellen zu messen.

In Abbildung 13 sind alle Versuche als Balkendiagramme dargestellt. Wie man erkennen kann, reagieren PC12-Zellen, die mit 2500 ng/ml NGF geprimt wurden (SUS-NGF), im Vergleich zu PC12-Zellen in Suspension ohne NGF (SUS), wesentlich empfindlicher auf eine Hypoxieexposition von 36 Stunden. Man erkennt, dass nicht nur die Anzahl der ANN+/PI+ Zellen, sondern auch die der ANN+ Zellen deutlich ansteigen. Bei den PI+ Zellen bewirkt die Hypoxie keine Veränderung.

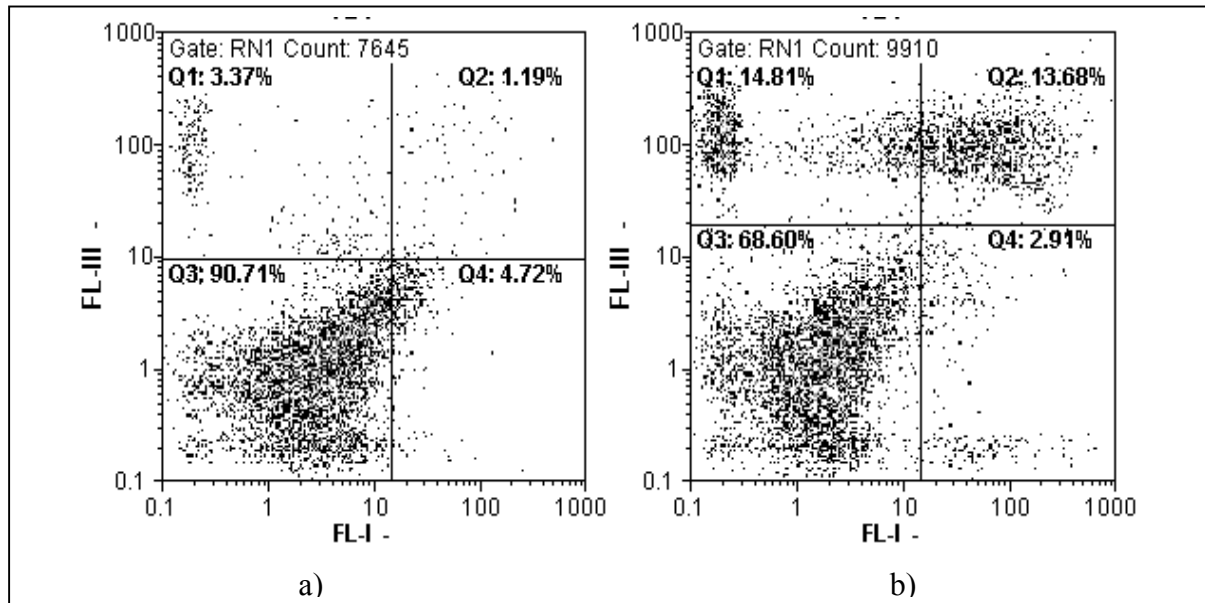


Abbildung 12: Punktehistogramm von PC12-Suspensionszellen, die mit NGF geprimt wurden (2500 ng/ml). a) In Normoxie und b) nach einer Hypoxieexposition von 36 Stunden. Dargestellt ist ein exemplarischer Versuch mit einer Doppelfärbung mit Annexin-V und PI. FL-III stellt die grüne Fluoreszenz (ANN) dar und FL-I die rote Fluoreszenz (PI). Die Analyse der Zellen erfolgte mit dem Galaxy FlowSystems von DAKO und wurde mit FlowMax-Software ausgewertet.

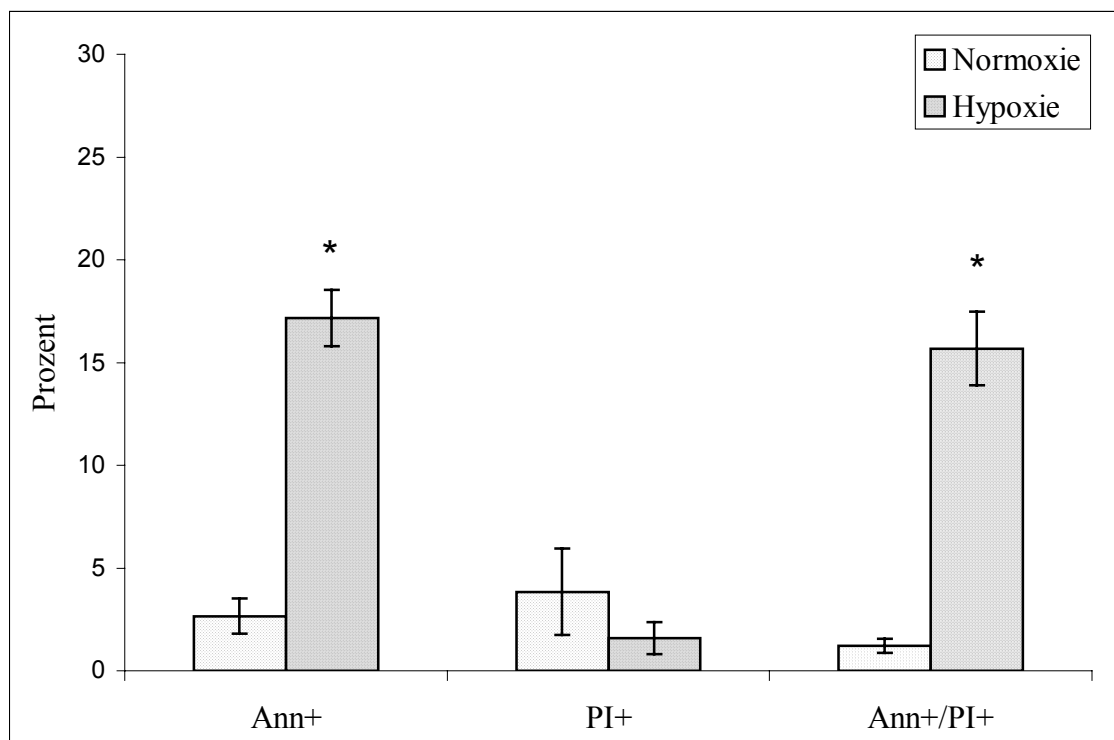


Abbildung 13: Geprimte PC12-Zellen mit 2500 ng/ml NGF in Normoxie und nach 36 Stunden Hypoxieexposition. Durchflusszytometrische Analyse bei einer Doppelfärbung mit Propidium-Jodid (PI) und Annexin-V. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent. n=3 unabhängige Versuche. * = $p < 0,01$.

4.2.3.3 Adhärente PC12-Zellen auf Kollagen

Bei den adhärennten PC12-Zellen auf Kollagen (KOLL-AD) zeigt sich ein anderes Bild als in der Suspensionskultur (SUS). In Abbildung 14 sind als Punktehistogramm adhärente PC12-Zellen (KOLL-AD) mit einer Doppelfärbung von Annexin-V und PI dargestellt. In der Normoxie befindet sich eine große Population ungefärbter Zellen im unteren linken Quadranten (a). Nach der Hypoxieexposition ist eine Population von ANN+/PI+ Zellen im oberen rechten Quadranten messbar (b). Im oberen linken Quadranten ist ein Anteil von ANN+ Zellen zu erkennen.

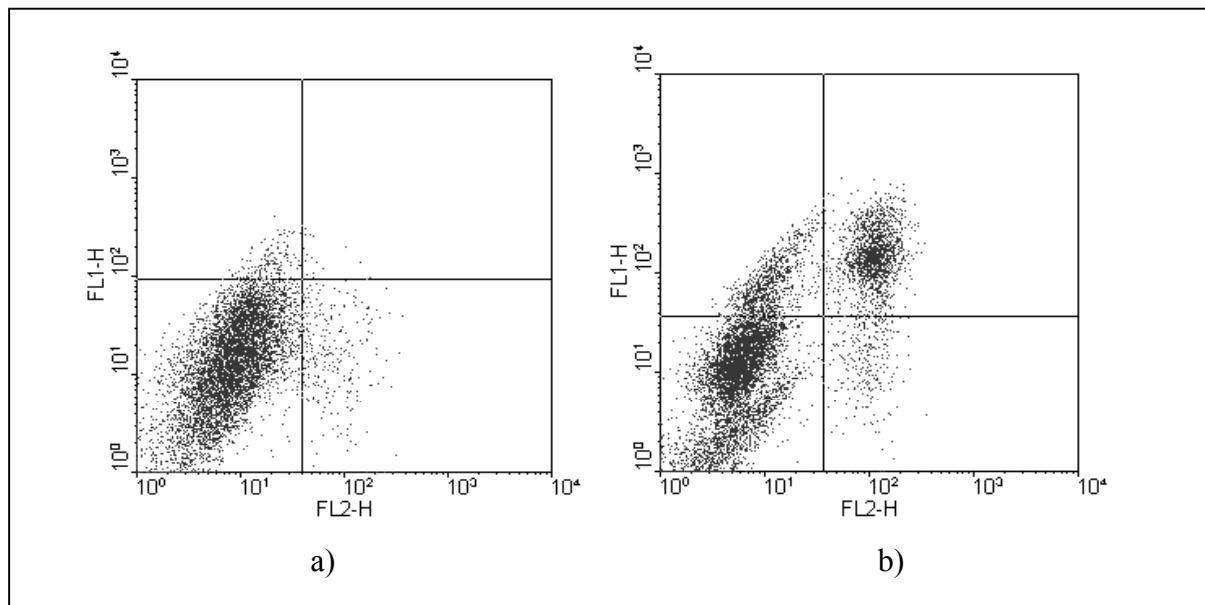


Abbildung 14: Punktehistogramm von adhärennten PC12-Zellen auf Kollagen (KOLL-AD). a) In Normoxie und b) nach einer Hypoxieexposition von 36 Stunden. Dargestellt ist ein exemplarischer Versuch mit einer Doppelfärbung mit Annexin-V und PI. FL1-H stellt die grüne Fluoreszenz (ANN) dar und FL2-H die rote Fluoreszenz (PI).

Im Balkendiagramm der Abbildung 15 erkennt man deutlich, wie nach 36 Stunden Hypoxie die Anzahl der ANN+ Zellen ansteigt. Bei den PI+ Zellen gibt es keine Veränderung durch die Hypoxie. Bei den ANN+/PI+ Zellen ist der Unterschied am deutlichsten. Der Anteil der ANN+/PI+ Zellen steigt bis auf 60 % an.

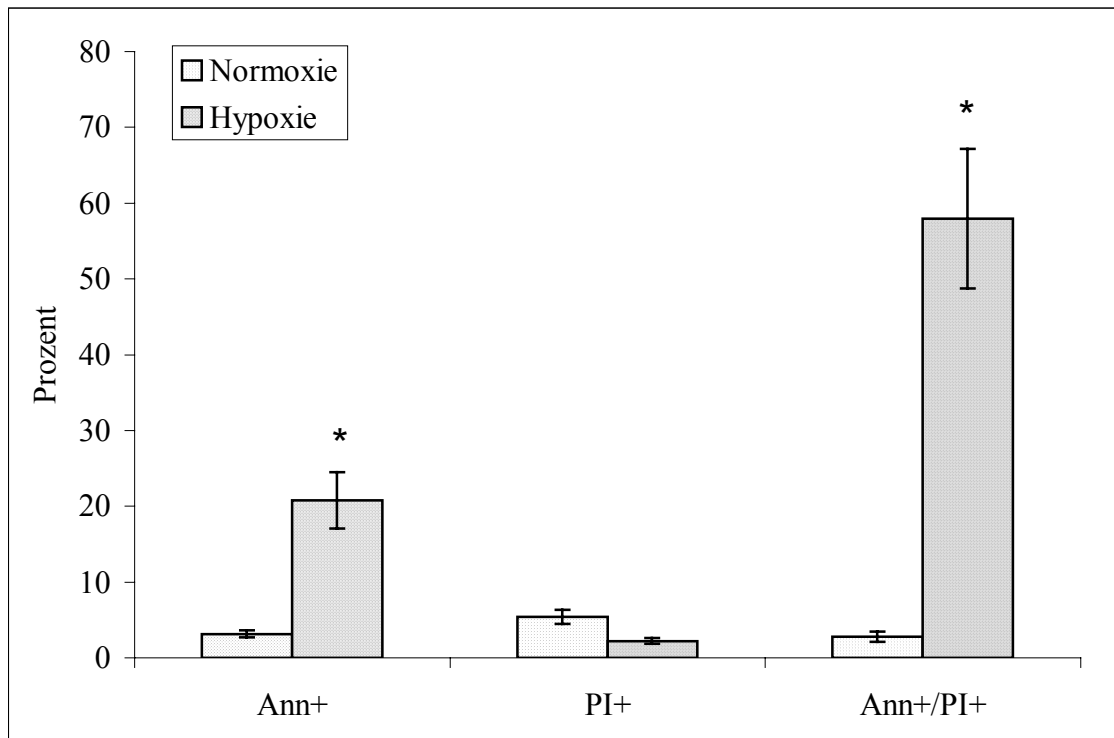


Abbildung 15: Adhärenz PC12-Zellen auf Kollagen (KOLL-AD) in Normoxie und nach 36 Stunden Hypoxieexposition. Durchflusszytometrische Analyse mit Doppelfärbung von Propidium-Jodid und Annexin-V. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent. $n=3$ unabhängige Versuche. * = $p < 0,01$.

4.2.3.4 Adhärenz PC12-Zellen auf Kollagen mit NGF

Bei adhärenz PC12-Zellen auf Kollagen mit NGF (KOLL-AD-NGF), zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei adhärenz PC12-Zellen auf Kollagen ohne NGF (KOLL-AD). In der Abbildung 16a, als Punkthistogramm dargestellt, erkennt man die Verteilung der gefärbten Zellen. In der Normoxie befindet sich ein großer Anteil ungefärbter Zellen im unteren linken Quadranten. Nach der Hypoxieexposition von 36 Stunden (Abbildung 16b) ist ein hoher Anteil von ANN+/PI+ Zellen im oberen rechten Quadranten und ein geringer Anteil von ANN+ Zellen im oberen linken Quadranten messbar. Bereits nach 36 Stunden ist ein deutlicher Zelltod zu erkennen.

Die Darstellung des Mittelwertes \pm SEM der Versuche der adhärenz PC12-Zellen mit NGF (KOLL-AD-NGF) bestätigt das Ergebnis des exemplarisch dargestellten Punkthistogramms (Abbildung 17). Nach Hypoxie steigt die Anzahl von ANN+ Zellen auf ca. 27% und von ANN+/PI+ Zellen auf ca. 45% an. Bei den PI+ Zellen zeigt die Hypoxie keine Veränderung.

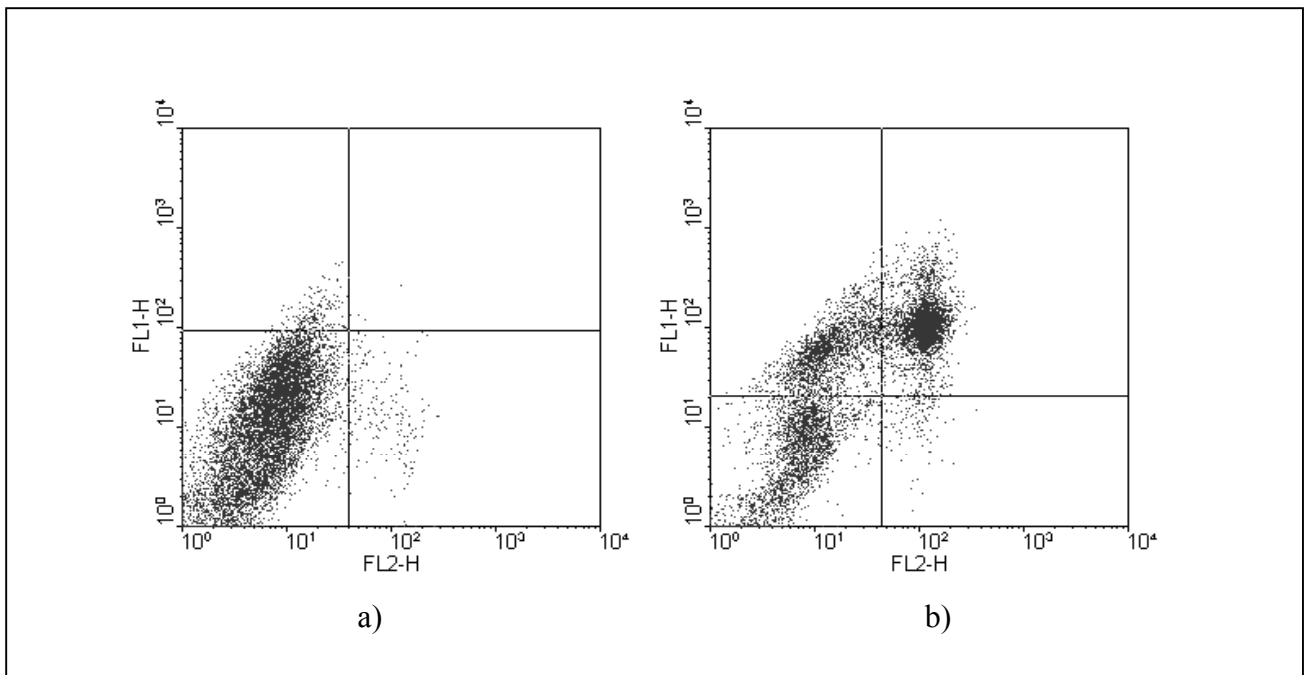


Abbildung 16: Punktehistogramm von adhärennten PC12-Zellen auf Kollagen mit NGF (2500 ng/ml) (KOLL-AD-NGF). a) In Normoxie und b) nach einer Hypoxieexposition von 36 Stunden. Dargestellt ist ein exemplarischer Versuch mit einer Doppelfärbung mit Annexin-V und PI. FL1-H stellt die grüne Fluoreszenz (ANN) dar, FL2-H die rote Fluoreszenz (PI).

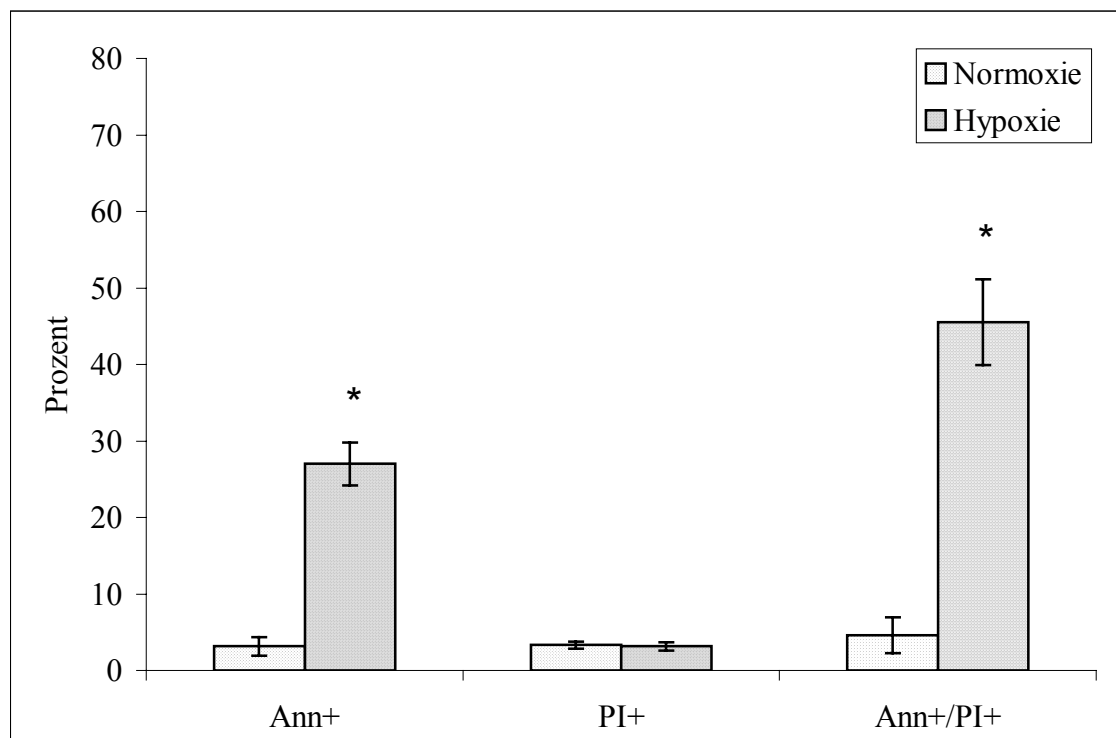


Abbildung 17: Adhärennte PC12-Zellen auf Kollagen mit NGF in Normoxie und nach 36 Stunden Hypoxieexposition. Durchflusszytometrische Analyse bei einer Doppelfärbung mit Propidium-Jodid und Annexin-V. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent. $n = 3$ unabhängige Versuche. * = $p < 0,01$

4.3 Hypoxie und die HIF-1-Aktivität

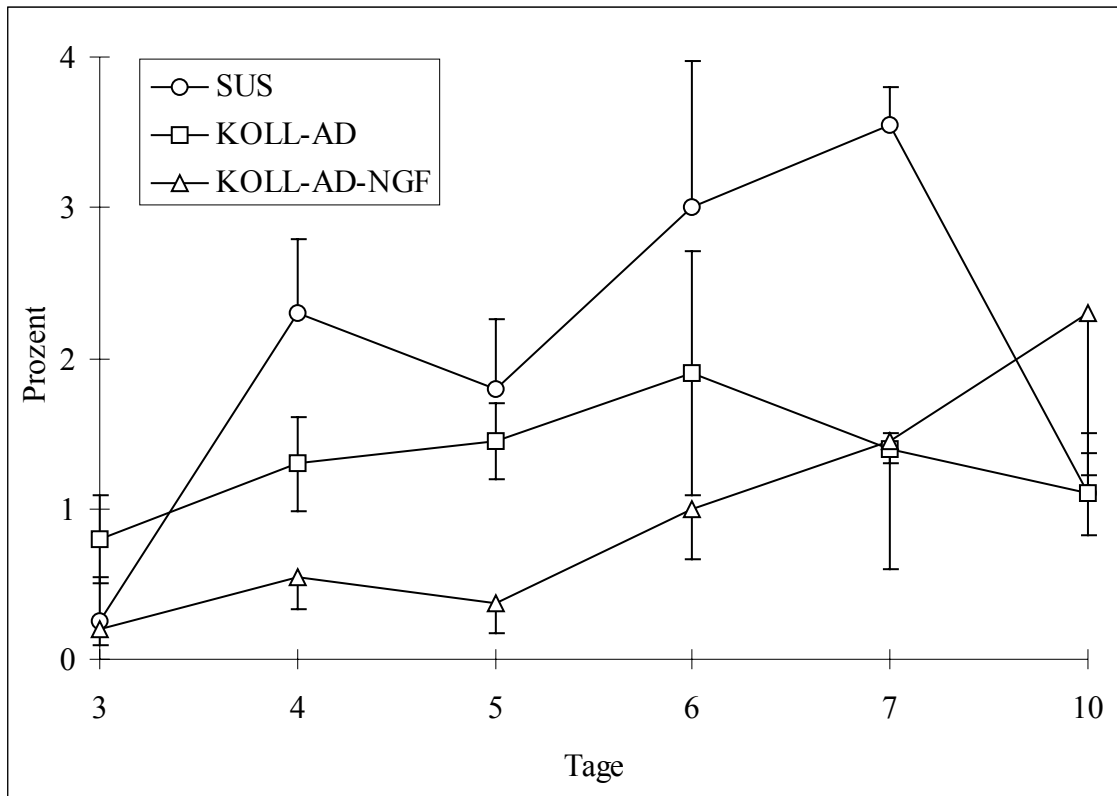
Wie im Abschnitt Zelltod gezeigt, reagieren die verschiedenen Phänotypen der PC12-Zellen unterschiedlich auf eine Hypoxieexposition. Der Vergleich der Häufigkeit des Zelltodes zur HIF-1-Aktivität der Phänotypen kann Aufschluss über die Beziehungen zwischen HIF-1-Aktivität und dem Zelltod liefern. Zur Bestimmung der HIF-1-Aktivität benutzten wir die Reporterplasmide pGL3 und pHBE (Kietzmann et al., 2001). Vorversuche ergaben, dass eine Transfektion mit Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation nicht möglich war. Wir entschieden uns daher für das Transfektionsreagenz Transfast (Promega, Mannheim).

4.3.1 Transfektionseffizienz

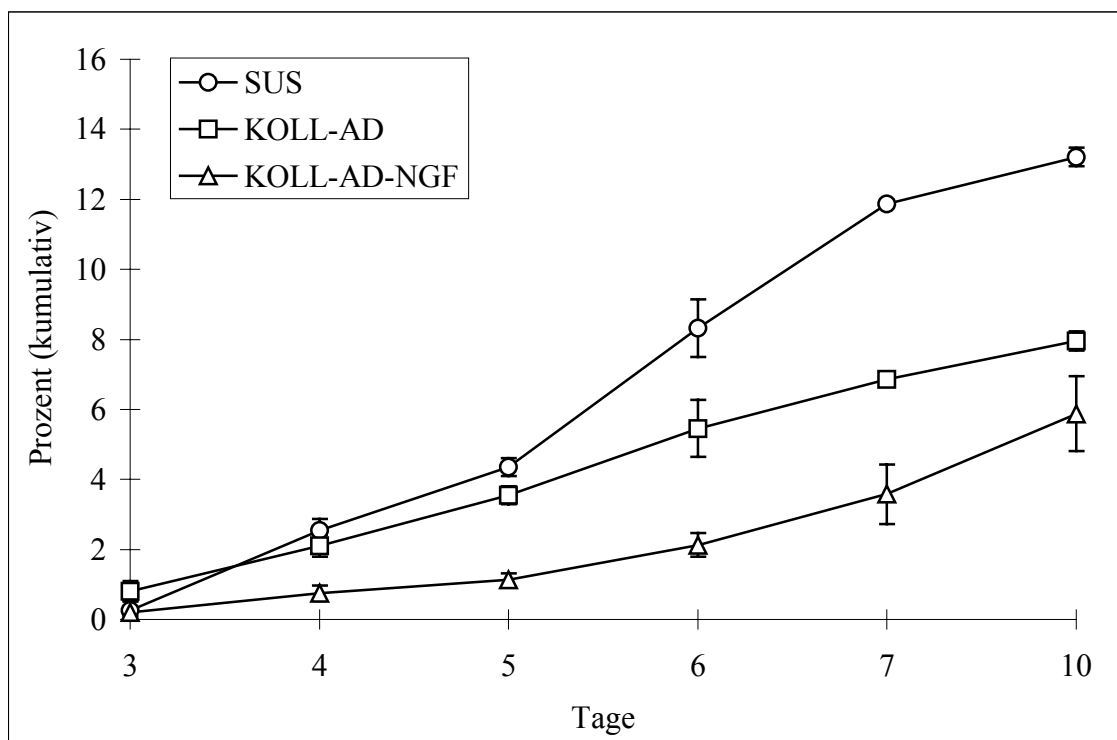
Für die Beurteilung der Messergebnisse von verschiedenen Zell-Phänotypen ist es wichtig, die Transfektionseffizienz zu untersuchen. Hierzu haben wir die Transfektion mit pGFP und die Zählung der fluoreszierenden Zellen gewählt.

Das Plasmid pGFP eignet sich zur Messung der Transfektionseffizienz, da die transfizierten Zellen sich fluoreszenzmikroskopisch nachweisen lassen. Hierzu wurden PC12-Zellen am Tag 0 ausgesät und am Tag 2 mit pGFP transfiziert. Am Tag 3 ließen sich noch keine Unterschiede erkennen (Abbildung 18). Ab Tag 4 zeigte sich allerdings eine unterschiedlich hohe Prozentzahl der mit pGFP transfizierten PC12-Zellen in Suspension (SUS), adhären auf Kollagen (KOLL-AD) und adhären auf Kollagen mit NGF (KOLL-AD-NGF) wachsenden Zellen. Um die Gesamtheit der transfizierten Zellen zu erfassen, wählten wir die Darstellung in Form einer kumulativen Verteilung über 10 Tage (Abbildung 18b). Der größte Anteil der pGFP transfizierten Zellen ließ sich in der Suspensionskultur (SUS) nachweisen. Nach 10 Tagen kontinuierlichen Anstiegs der mit pGFP transfizierten PC12-Zellen sind über 13 Prozent der Zellen transfiziert. Bei den adhären PC12-Zellen auf Kollagen (KOLL-AD) sind nach 10 Tagen ca. 7 Prozent transfiziert. Bei den adhären PC12-Zellen auf Kollagen mit NGF (KOLL-AD-NGF) sind nach 10 Tagen ca. 5 Prozent transfiziert.

Die große Streuung der prozentualen Darstellung (Abb.18a) lässt sich wahrscheinlich durch die Vielzahl der beteiligten Prozesse erklären. Die Transfektion mit pGFP beinhaltet die Aufnahme der DNA in die Zelle, den Transport über die Zellmembran, die Synthese der Luciferase, die Absterbe- und Proliferationsrate der Zellen. In der kumulativen Darstellung wird die Kinetik der Einzelprozesse nicht erfasst, daraus resultiert eine geringere Streuung als in der prozentualen Darstellung.



a)



b)

Abbildung 18: Prozentuale a) und prozentuale kumulative Darstellung b) der pGFP Expression der PC12-Zellen in Suspension (SUS), adhären (KOLL-AD) und adhären mit NGF (KOLL-AD-NGF). Die Zellen wurden am Tag 0 ausgesät und am Tag 2 mit pGFP transfiziert. n=6. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Durch die Transfektion mit Transfast werden ungefähr 5-10 % der Zellen transfiziert. Man erkennt an der Abbildung 18b), dass die Transfektionseffizienz der adhärennten PC12-Zellen auf Kollagen mit NGF (KOLL-AD-NGF) deutlich geringer ist als die der Suspensionskultur (SUS) und die der adhärennten PC12-Zellen ohne NGF (KOLL-AD). Das ausgewählte Transfektionsverfahren ist aber ausreichend, um eine Aussage zur Expression eines Plasmides zu treffen. Aus den Messungen der Transfektionseffizienz ergibt sich, dass der Bezug auf den Kontrollvektor pGL3, zum Vergleich der unterschiedlichen Phänotypen, unerlässlich ist.

4.3.2 Transfektionsoptimierung

Für eine zuverlässige Messung der luminometrischen Aktivität bei einer Transfektion mittels Reportergenen ist eine Optimierung der Messbedingungen notwendig. Ziel der Optimierung ist es, jene Reaktionsbedingungen zu finden, die eine reproduzierbare und richtige Messung der Expression erlauben.

4.3.2.1 Plasmidgehalt

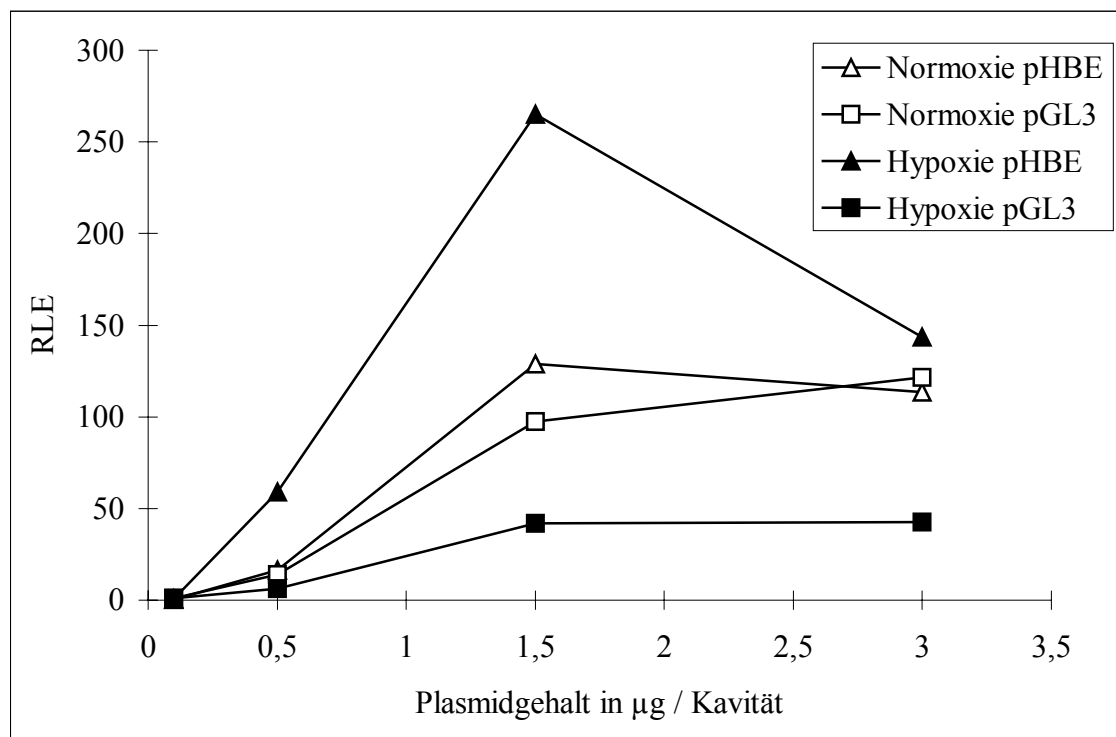


Abbildung 19: Abhängigkeit der luminometrischen Aktivität vom Plasmidgehalt. Dargestellt sind die RLE-Absolutwerte der einzelnen Vektoren in Kontrolle und nach 24 Stunden Hypoxieexposition. Die verwendeten Plasmidmengen sind: 0,1 µg, 0,5 µg, 1,5 µg und 3 µg Plasmid/Kavität, RLE = Relative luminometrische Einheit.

Zunächst untersuchten wir die Abhängigkeit der luminometrischen Aktivität der Vektoren pGL3 und pHBE vom Plasmidgehalt/Kavität in Normoxie und Hypoxie (Abbildung 19). In Normoxie steigt mit zunehmender Plasmidmenge die luminometrische Aktivität der Vektoren pGL3 und pHBE bis 1,5 µg Plasmid/Kavität an und geht dann in ein Plateau über. Es gibt keine Unterschiede in der luminometrischen Aktivität zwischen pGL3 und pHBE in der Normoxie.

In der Hypoxie ist die Expression der Vektoren pGL3 und pHBE unterschiedlich. Die Aktivität des Vektors pHBE steigt ebenfalls bis zu einer Plasmidmenge von 1,5 µg/Kavität an, erreicht aber höhere Absolutwerte (265 RLE) in der luminometrischen Aktivität. Oberhalb einer Konzentration von 1,5 µg Plasmid/Kavität sinkt die Aktivität bis auf 150 RLE. Der Vektor pGL3 steigt bis 1,5 µg Plasmid/Kavität an und geht in ein Plateau über. In diesen Versuchen waren die Absolutwerte von pGL3 in Hypoxie geringer als pGL3 in Normoxie. Der höchste erreichte Wert liegt bei ca. 40 RLE. Hypoxie scheint einen Einfluss auf die Expression von pGL3 zu haben.

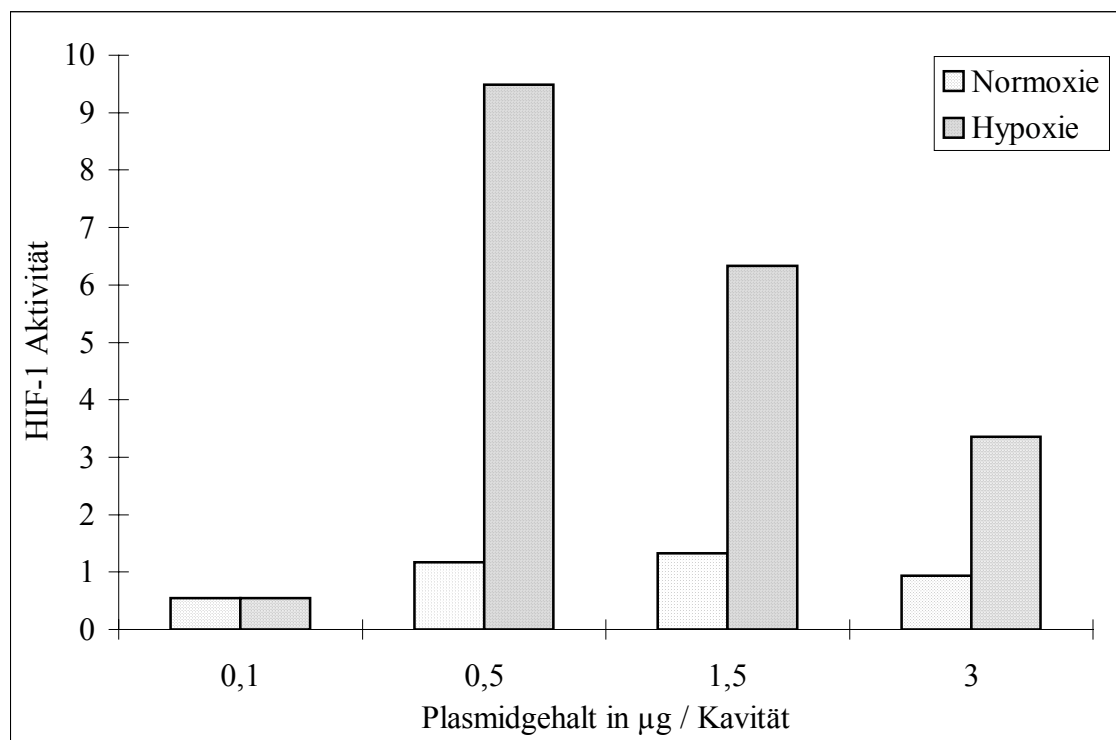


Abbildung 20: Abhängigkeit der HIF-1 Aktivität vom Plasmidgehalt. Dargestellt ist der Quotient pHBE/pGL3 in Normoxie und nach 24 Stunden Hypoxieexposition. Die verwendeten Plasmidmengen sind: 0,1 µg, 0,5 µg, 1,5 µg und 3 µg Plasmid/Kavität.

In der Abbildung 20 ist die für die jeweilige Versuchsbedingung errechnete HIF-1-Aktivität, abhängig von der Plasmidkonzentration, dargestellt. Die höchste HIF-1-Aktivität liegt bei 0,5 µg Plasmid/Kavität und nimmt in Hypoxie mit steigendem Plasmidgehalt/Kavität ab. Bei 0,1 µg Plasmid/Kavität ist eine kaum messbare HIF-1-Aktivität in Normoxie und Hypoxie zu erkennen.

Aus dem Vergleich von Abbildung 19 und Abbildung 20 erkennt man, dass der Absolutwert der luminometrischen Aktivität der Vektoren bei 0,5 µg Plasmid/Kavität sehr gering ist und mit höherem Plasmidgehalt steigt. Um eine ausreichend hohe luminometrische Aktivität und keine großen Schwankungen aufgrund von Abweichungen kleiner Plasmidmengen zu erhalten, entschieden wir uns für 2 µg Plasmid/Kavität für die weiteren Versuche.

4.3.2.2 Lipidgehalt

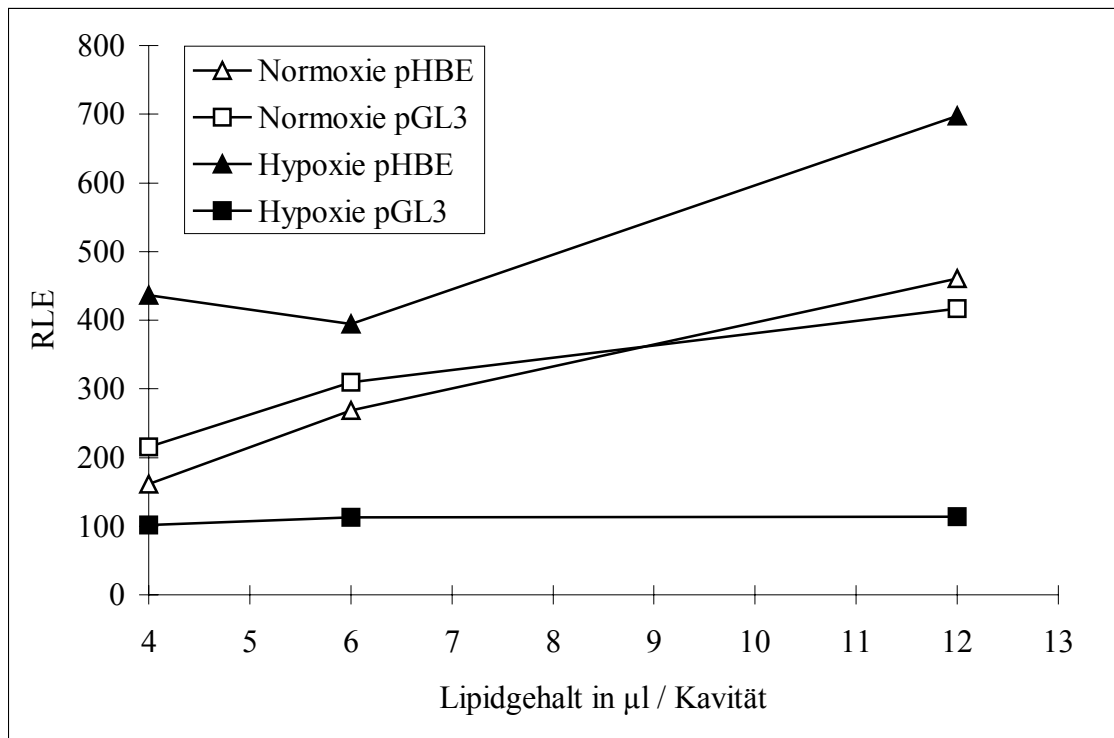


Abbildung 21: Abhängigkeit der luminometrischen Aktivität von der Lipidkonzentration. Dargestellt sind die Absolutwerte der einzelnen Vektoren in Kontrolle und nach 24 Stunden Hypoxieexposition. Die verwendeten Lipidmengen sind: 4 µl Lipid/Kavität, 6 µl Lipid/Kavität und 12 µl Lipid/Kavität.

Weiter untersuchten wir die Abhängigkeit der luminometrischen Aktivität von der Lipidkonzentration. In der Abbildung 21 ist die luminometrische Aktivität der Vektoren pGL3 und pHBE in Normoxie und Hypoxie in Abhängigkeit zum Lipidgehalt/Kavität dargestellt. Die Vektoren pGL3 und pHBE verhalten sich in Normoxie gleich und steigen mit zunehmendem Lipidgehalt von ca. 200 RLE bei 4 µl Lipid/Kavität bis ca. 380 RLE bei 12 µl Lipid/Kavität an. In der Hypoxie ist die Expression der Vektoren unterschiedlich: Der Vektor pGL3 in Hypoxie ist von der Lipidkonzentration unbeeinflusst und liegt bei 100 RLE. Der Vektor pHBE ist in der luminometrischen Aktivität höher und steigt bis fast 700 RLE an.

Die HIF-1-Aktivität (Abbildung 22) zeigt ein ähnliches Bild wie die absoluten Werte der RLE der Vektoren in Abbildung 21. In Normoxie beeinflusst der steigende Lipidgehalt die HIF-1-

Aktivität nur gering. Sie steigt mit zunehmendem Lipidgehalt leicht an. Nach Hypoxieexposition erkennt man deutliche Unterschiede: Die höchste HIF-1-Aktivität wird bei 12 μl Lipid/Kavität mit 6,1 erreicht. Bei 4 und 6 μl Lipid/Kavität liegt sie bei ca. 4.

Da die Lipide relativ teuer sind und mit einem geringeren Lipidgehalt eine ausreichende RLE-Aktivität bei geringen Schwankungen gemessen werden kann, entschieden wir uns, die weiteren Versuche mit 6 μl Lipid/Kavität durchzuführen.

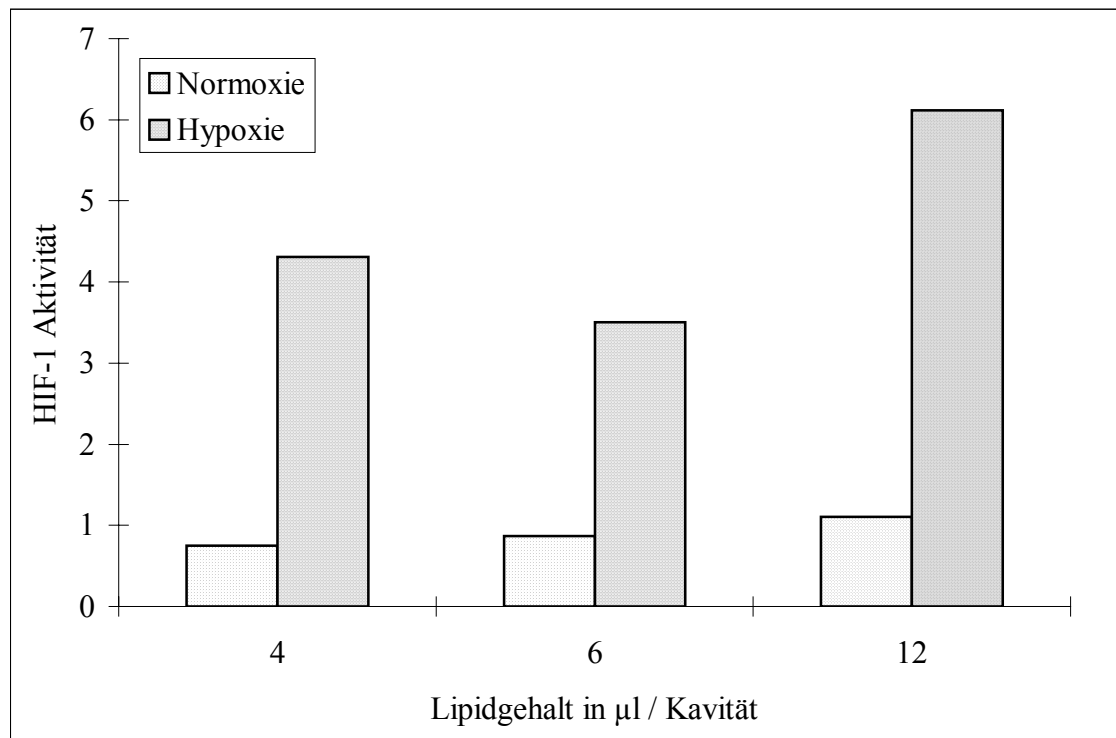


Abbildung 22: Abhängigkeit der HIF-1-Aktivität von dem Lipidgehalt. Dargestellt ist der Quotient pHBE/pGL3 in Normoxie und nach Hypoxieexposition. Die verwendeten Lipidmengen sind: 4 μl Lipid/Kavität, 6 μl Lipid/Kavität und 12 μl Lipid/Kavität.

4.3.2.3 Zellzahl

Als weitere Optimierungsuntersuchung analysierten wir die Abhängigkeit der luminometrischen Aktivität von der Zellzahl/Kavität. In der Abbildung 23 ist die luminometrische Aktivität der Vektoren pGL3 und pHBE in Normoxie und nach 24 Stunden Hypoxieexposition bei unterschiedlicher Zellzahl/Kavität dargestellt. Die Vektoren pGL3 und pHBE verhalten sich in Normoxie ähnlich und lassen keinen Unterschied mit zunehmender Zellzahl/Kavität erkennen.

In der Hypoxie verhalten sich die Vektoren unterschiedlich: Der pGL3 Vektor in Hypoxie sinkt mit zunehmender Zellzahl/Kavität ab. Der Vektor pHBE ist in der luminometrischen Aktivität höher und steigt mit steigender Zellzahl/Kavität leicht an.

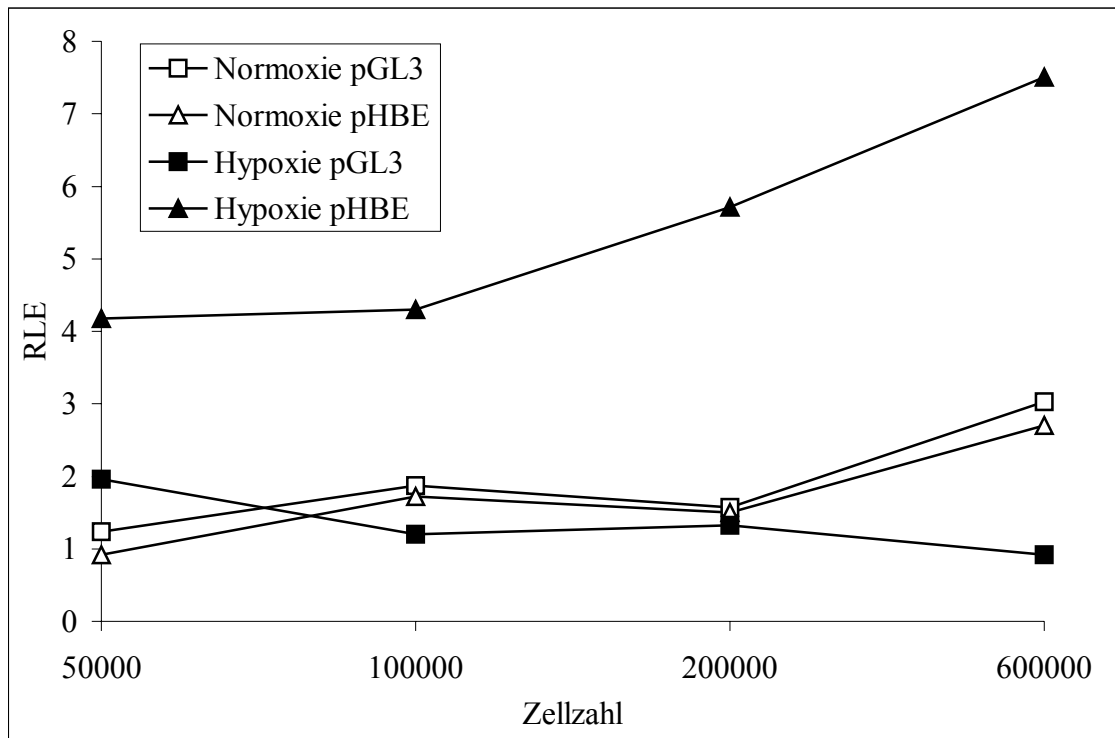


Abbildung 23: Luminometrische Aktivität bei unterschiedlicher Zellzahl/Kavität. Dargestellt sind die Absolutwerte der einzelnen Vektoren in Kontrolle und Hypoxie. Gewählt wurde folgende Zellzahl/Kavität: 50000 Zellen, 100000 Zellen, 200000 Zellen und 600000 Zellen. Leerwert = 0,1 RLE.

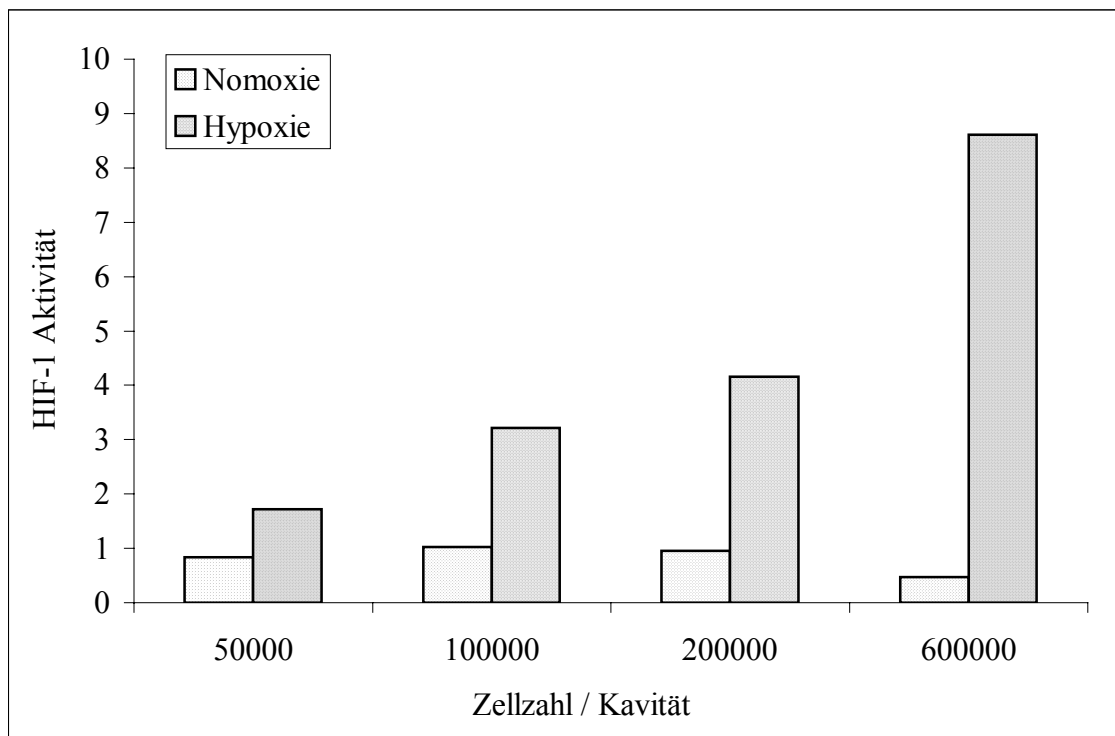


Abbildung 24: HIF-1-Aktivität bei unterschiedlicher Zellzahl/Kavität. Dargestellt ist der Quotient pHBE/pGL3 in Normoxie und nach 24 Stunden Hypoxieexposition. Gewählt wurden folgende Zellzahl/Kavität: 50000 Zellen, 100000 Zellen, 200000 Zellen und 600000 Zellen.

In der Normoxie scheint sich die HIF-1-Aktivität mit steigender Zellzahl leicht zu vermindern (Abbildung 24). Bei 50000 Zellen/Kavität liegt sie bei 1, bei 600000 Zellen/Kavität bei 0,5. Nach Hypoxieexposition steigt die HIF-1-Aktivität mit zunehmender Zellzahl/Kavität an. Bei 50000 Zellen/Kavität findet durch die Hypoxie eine Aktivierung um den Faktor 2 statt. Bei 100000 Zellen/Kavität liegt die HIF-1-Aktivität bei 3, bei 200000 Zellen/Kavität bei 4 und bei 600000 Zellen/Kavität liegt sie bei 18.

An den RLE-Absolutwerte in Abbildung 23 wird deutlich, dass diese große Aktivierung sowohl durch eine Verminderung des pGL3-Vektors in der Hypoxie als auch durch eine Erhöhung des pHBE-Vektors mit zunehmender Zellzahl erklärbar ist. Um eine ausreichend hohe luminometrische Aktivität zu messen, aber nicht in den Bereich der Glukosedepprivation nach der Hypoxieexposition zu kommen, entschieden wir uns für 300000 Zellen/Kavität.

Wie die vorangegangenen Versuche zeigen, werden sowohl die errechnete HIF-1-Aktivität, als auch die absolute luminometrische Aktivität durch die unterschiedlichen Bedingungen beeinflusst. Daher kommt der Einhaltung konstanter Messbedingungen große Bedeutung zu. Alle nachfolgenden Untersuchungen wurden unter standardisierten Bedingungen durchgeführt: 2 µg Plasmid/Kavität, 6 µl Lipid/Kavität, 300000 Zellen/Kavität.

4.3.3 Effekte auf die Expression des Kontrollvektors pGL3

4.3.3.1 Kontrollvektor pGL3 bei PC12-Zellen in Suspension und der Einfluss von NGF

Aus den vorherigen Versuchen wurde deutlich, dass die Expression des Kontrollvektors durch Hypoxie beeinflusst wird (Abbildung 19). Um eine mögliche Beeinflussung der Expression des pGL3-Vektors durch NGF zu untersuchen, prüften wir den Einfluss steigender NGF-Dosen auf die RLE-Aktivität in Normoxie und Hypoxie (Tabelle 1).

In Normoxie steigt mit steigender Konzentration des NGF die Expression des pGL3-Vektors. Unter hypoxischen Bedingungen beobachtet man den gegenteiligen Effekt: Mit steigender Konzentration des NGF verringert sich die Expression des pGL3-Vektors.

Tabelle 1: Einfluss von NGF auf die Expression des Kontrollvektor pGL3 in geprimten PC12-Zellen

NGF	Normoxie	Hypoxie
Kontrolle (0 ng/ml NGF)	100	78 ± 17
100 ng/ml	186 ± 37*	87 ± 22
500 ng/ml	319 ± 81*	51 ± 11
2500 ng/ml	339 ± 58*	59 ± 23

Dargestellt in % von der Kontrolle und als Mittelwert ± SEM. n = 3 unabhängige Versuche. * = p<0,05 gegenüber der Kontrolle (Scheffé-Test). Die PC12-Zellen wurden am Tag 0 mit NGF geprimt und am Tag 2 transfiziert.

4.3.3.2 Kontrollvektor pGL3 bei adhären PC12-Zellen und der Einfluss von NGF

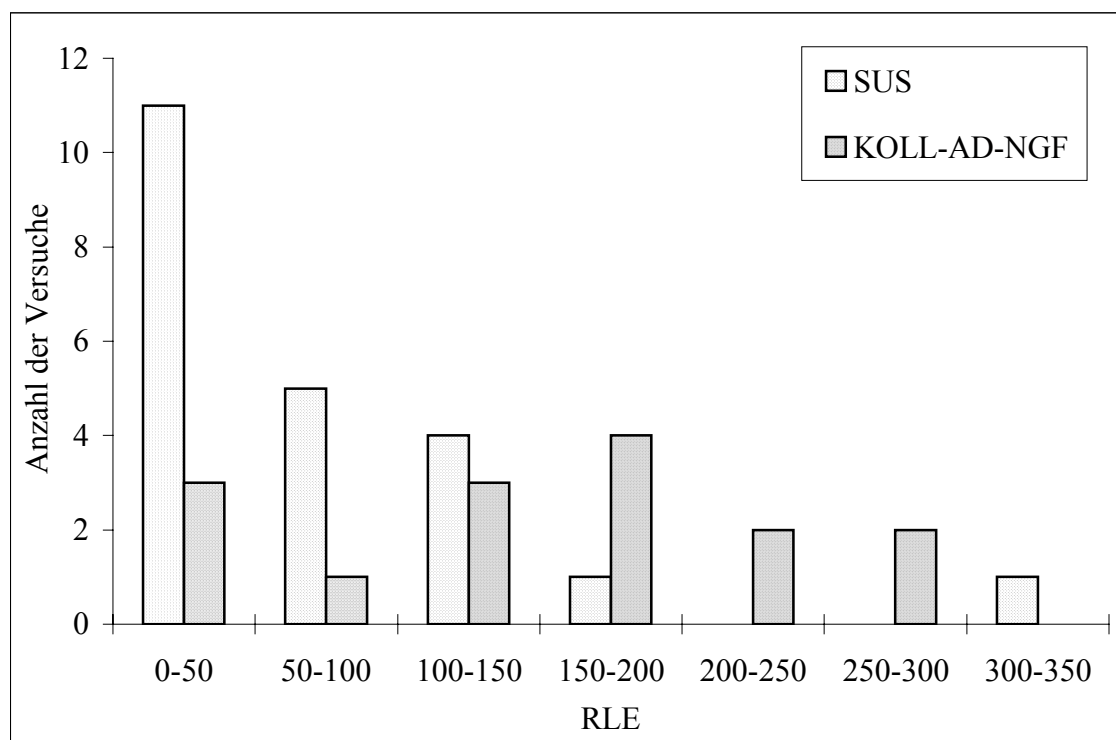


Abbildung 25: Luminometrische Aktivität des pGL3-Vektors bei PC12-Zellen in Suspension (SUS) und bei adhären PC12-Zellen mit NGF (KOLL-AD-NGF) in Normoxie. Dargestellt ist die Anzahl der Versuche, die jeweils in einen definierten RLE-Bereich fallen (0-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300 und 300-350). Die Zellen wurden am Tag 0 ausgesät und am Tag 2 transfiziert. Die KOLL-AD-NGF-Kultur wurde mit 500 mg/ml NGF ausgesät.

Wie in Abbildung 25 gezeigt, liegen bei den meisten Transfektionen die gemessenen RLE-Werte der PC12-Zellen in Suspension (SUS) zwischen 0 und 50 RLE (n=11). Wenige Transfektionen erreichen hohe RLE-Werte. Lediglich zwei Versuche liegen zwischen 300 und 350 RLE.

Bei den adhärennten PC12-Zellen, auf Kollagen gewachsen und mit NGF behandelt, sind die Schwankungen sehr groß. Drei Transfektionen liegen im Bereich von 0 bis 50 RLE, vier Transfektionen zeigen RLE-Werte im Bereich zwischen 150 und 200 und weitere zwei liegen im Bereich zwischen 250 und 300 RLE.

Mit dem Kolmogoroff-Smirnoff-Zwei-Proben-Test zeigt sich, dass die Phänotypen einer unterschiedlichen Verteilung folgen. Mit dem Mann-Whitney-Test ergibt sich ein signifikanter Unterschied von $p < 0,01$ zwischen der Suspensionskultur (SUS) und den adhärennten PC12-Zellen auf Kollagen mit NGF (KOLL-AD-NGF). NGF erhöht folglich die Expression des pGL3-Vektors auch in adhärennten PC12-Zellen mit NGF (KOLL-AD-NGF) unter normoxischen Bedingungen.

Wie an Abbildung 26 erkennbar, vermindert die Hypoxie die Expression des Kontrollvektors pGL3 im Vergleich zur Normoxie in der KOLL-AD-NGF-Kultur. Die Expression in Hypoxie ist geringer als die Expression der Suspension Kultur (SUS).

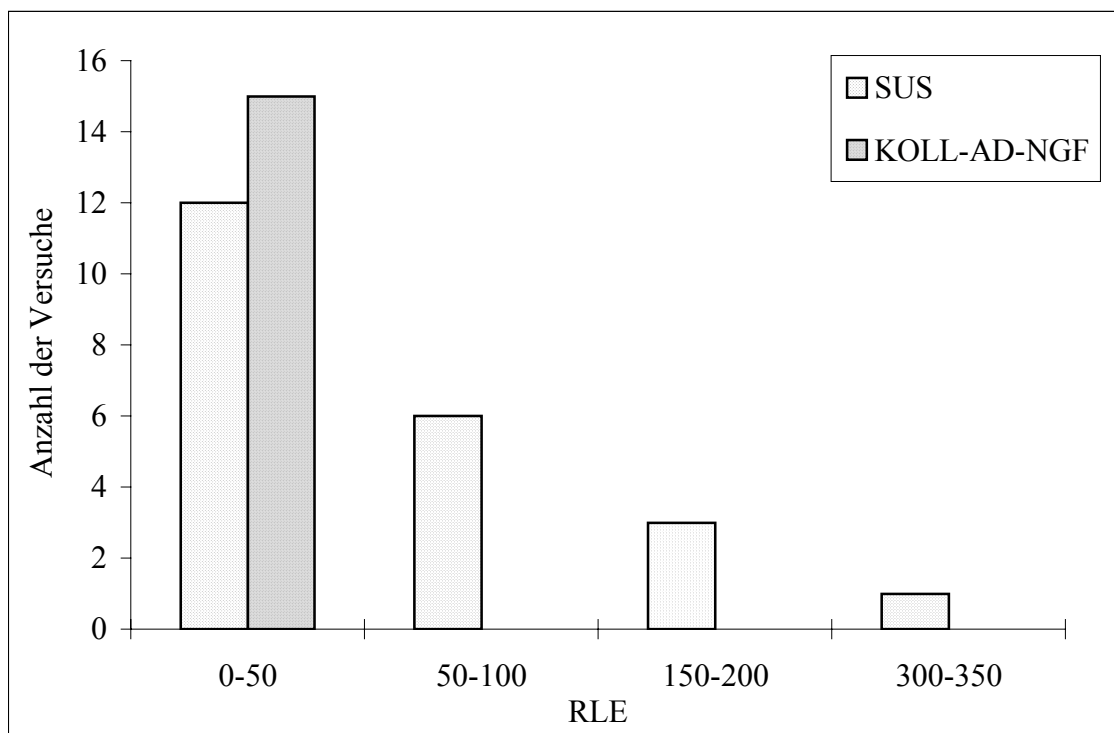


Abbildung 26: Luminometrische Aktivität des pGL3-Vektors bei PC12-Zellen in Suspension und bei adhärennten PC12-Zellen nach 24 Stunden Hypoxieexposition. Dargestellt ist die Anzahl der Versuche, die jeweils in einen definierten RLE-Bereich fallen (0-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300 und 300-350). Die Zellen wurden am Tag 0 ausgesät und am Tag 2 transfiziert. Die KOLL-AD-NGF-Kultur wurde mit 500 mg/ml NGF ausgesät.

Die Versuche zeigen, dass Hypoxie- und NGF- induzierte Veränderungen immer das Resultat einer veränderten Expression sowohl des Kontrollvektors, als auch des Hypoxie-empfindlichen Vektors sind.

4.3.4 HIF-1-Aktivität von PC12-Zellen, unmittelbar vor der Hypoxie transfiziert

Als erstes untersuchten wir die HIF-1-Aktivität der verschiedenen PC12-Phänotypen (Abbildung 28) und transfizierten die Zellen am Tag 2, unmittelbar vor der Hypoxieexposition. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 27 dargestellt.

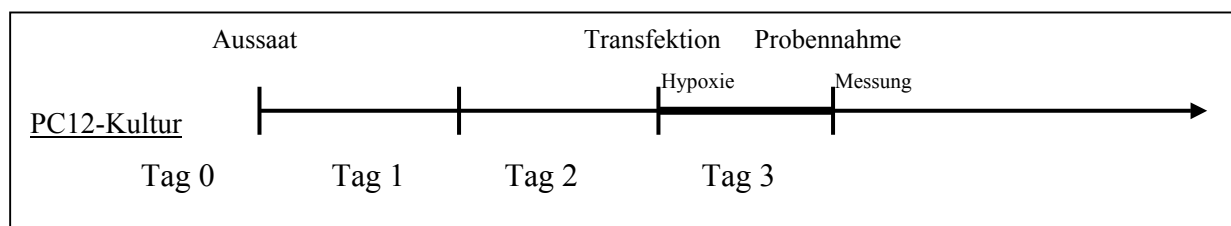


Abbildung 27: Versuchsablauf der PC12-Kulturen SUS, KOLL-AD und KOLL-AD-NGF. Zu einer Kultur unter hypoxischen Bedingungen wurde parallel eine Kontrollgruppe in Normoxie angesetzt.

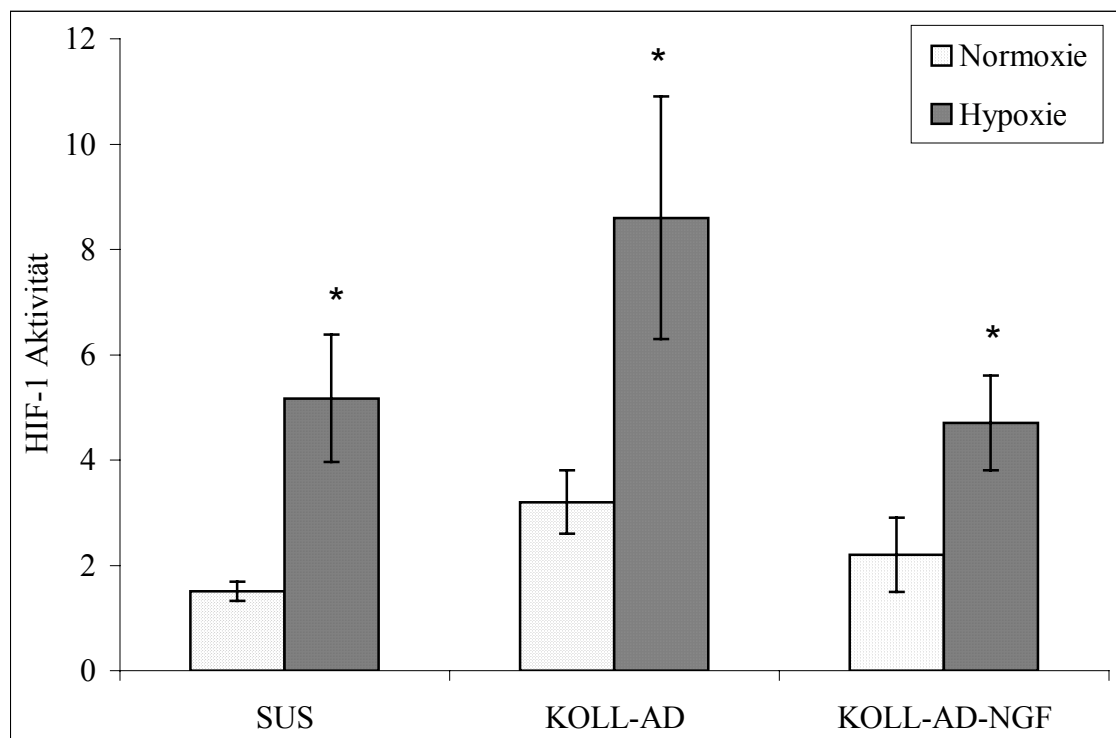


Abbildung 28: HIF-1-Aktivität in den drei Zellkulturen Suspension (SUS), adhärenente Zellen auf Kollagen (KOLL-AD) und adhärenente Zellen auf Kollagen mit NGF (KOLL-AD-NGF). * = $p < 0,01$ im Unterschied zur Normoxie. $n=15$ unabhängige Versuche in Suspension (SUS) und $n=5$ bei adhärenenten Zellen (KOLL-AD) und adhärenenten Zellen mit NGF (KOLL-AD-NGF). Hypoxiedauer = 24 Stunden. NGF-Konzentration = 500 ng/ml.

Die HIF-1-Aktivität in verschiedenen Phänotypen von PC12-Zellen (SUS, AD-KOLL, AD-KOLL-NGF) ist in Abbildung 28 dargestellt. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Phänotypen in der Normoxie. Bei allen drei Phänotypen führt eine Hypoxie zu einem Anstieg der HIF-1-Aktivität. Auch in der Hypoxie ergeben sich zwischen den Phänotypen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Es scheint sich anzudeuten, dass die PC12-Zellen auf Kollagen mit NGF (KOLL-AD-NGF) eine geringere HIF-1-Aktivität im Vergleich zu der adhären PC12-Zellkultur auf Kollagen ohne NGF haben.

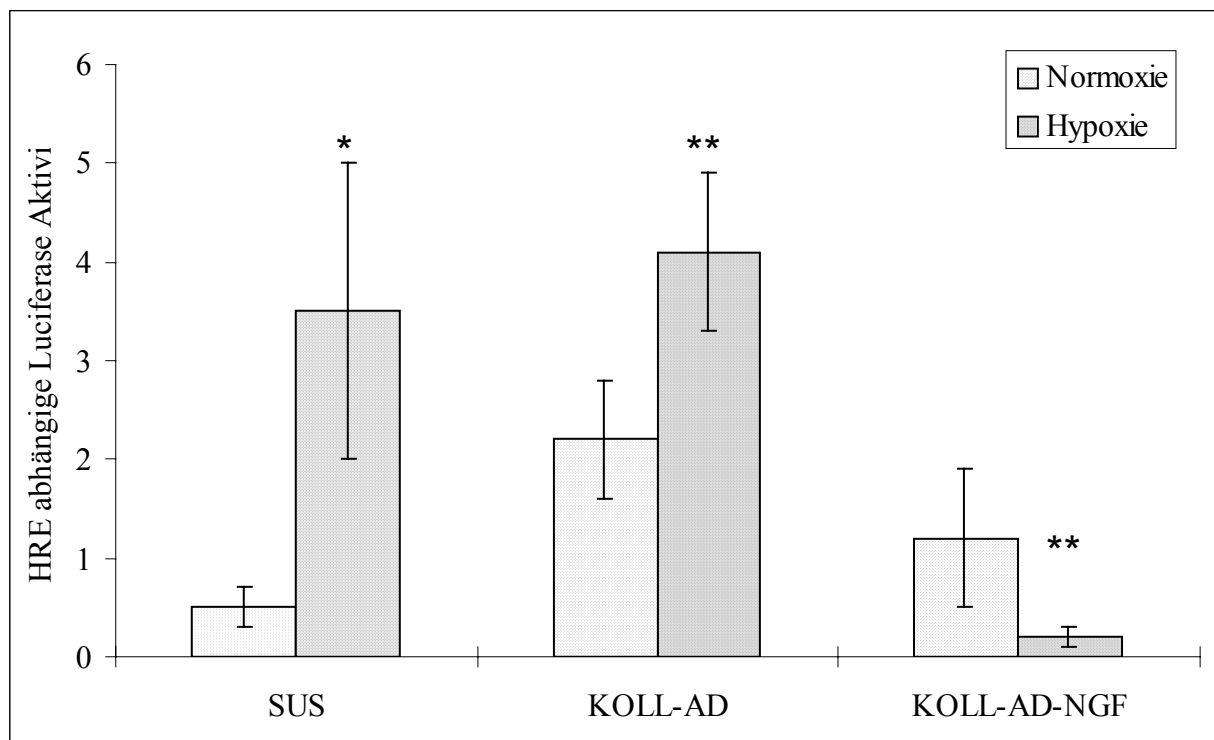


Abbildung 29: HRE abhängige Luciferase-Aktivität (pHBE-pGL3/pGL3). Dargestellt sind PC12-Zellen in Normoxie und nach 24 Stunden Hypoxieexposition in SUS, KOLL-AD, KOLL-AD-NGF. Ausgewertet wurden die Versuche der Abbildung 28. * = $p < 0,01$ und ** = $p < 0,001$ im Vergleich zur Normoxie.

Um den Einfluss von NGF auf die Hypoxie-induzierte Expression weiter zu analysieren, berechneten wir die Differenz der RLE-Aktivität von pHBE und pGL3 und bezogen diese auf den pGL3-Vektor (Abbildung 29). Die Differenz reflektiert die absolute RLE-Aktivität, die auf das Vorliegen der HRE-Sequenz im pHBE-Vektor zurückzuführen ist. Normiert man die RLE-Aktivität auf den pGL3-Vektor in Normoxie, fällt auf, dass die RLE-Aktivität der KOLL-AD-NGF Zellen in Hypoxie dramatisch abfällt. Die Wechselwirkung von NGF und Hypoxie führt zu einer generell verminderten Expression, sowohl vom pGL3-Vektor, als auch vom pHBE-Vektor. Der dramatische Abfall der RLE abhängigen Luciferase-Aktivität ist Ausdruck einer

Verminderung der RLE-Aktivität des pGL3- und des pHBE-Vektors in Hypoxie, wobei die des pHBE-Vektors deutlich stärker abfällt.

4.3.5 HIF-1-Aktivität von PC12-Zellen in Suspension und der Einfluss von NGF

Um den Einfluss von NGF unabhängig von dem adhärenenten Wachstum der Zellen auf Kollagen zu untersuchen, primten wir PC12-Zellen in Suspension mit NGF-Konzentrationen von 100 ng/ml, 500 ng/ml und 2000 ng/ml (SUS-NGF) und untersuchten die HIF-1-Aktivität in Normoxie und nach einer Hypoxieexposition von 24 Stunden.

Die HIF-1-Aktivität wurde nach folgendem Versuchsschema gemessen:

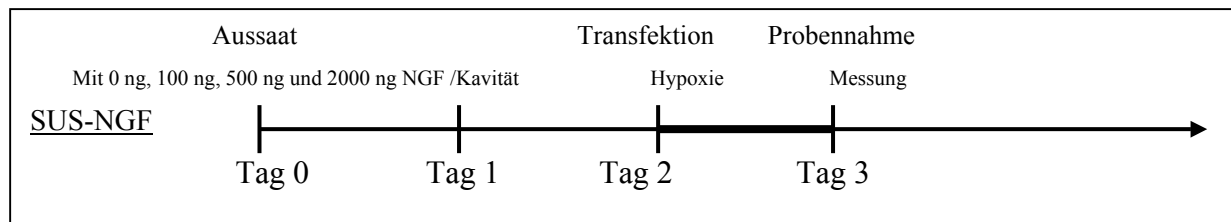


Abbildung 30: Versuchsablauf der PC12-Zellen geprimt mit unterschiedlichen Konzentrationen von NGF. Zu jedem Versuch wurde parallel noch eine Kontrollgruppe angesetzt, die sich lediglich durch die fehlende Hypoxieexposition unterschied.

In der Normoxie verändert die NGF-Konzentration die HIF-1-Aktivität nicht signifikant. Sie liegt bei ca. 2. Nach einer Hypoxieexposition findet in allen Kulturen eine HIF-1 Aktivierung statt. Mit steigender NGF-Konzentration nimmt aber die HIF-1 Aktivierung deutlich ab. Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Suspensionkultur (SUS) zeigten sich die Kulturen mit 500 ng/ml und 2000 ng/ml NGF. Die dosis-abhängigen Veränderungen der HIF-1-Aktivität sind in der Abbildung 31 dargestellt.

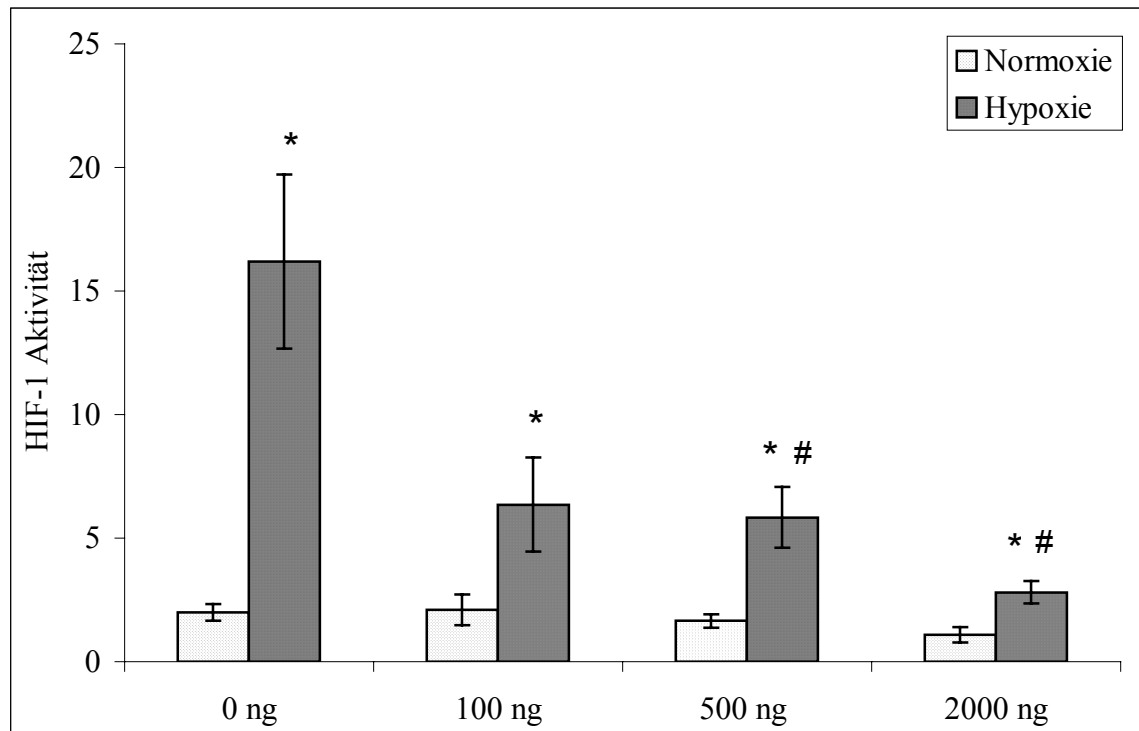


Abbildung 31: Mit NGF geprimte PC12-Zellen in Suspension in Normoxie und nach 24 Stunden Hypoxie. Verwendete NGF-Konzentrationen sind 0 ng/ml , 100 ng/ml , 500 ng/ml und 2000 ng/ml NGF. n=6 unabhängige Versuche, dargestellt mit dem Mittelwert \pm SEM. # = p < 0,01 im Vergleich zu 0 ng/ml NGF. * = p < 0,01 im Vergleich zur Normoxie.

4.3.6 HIF-1-Aktivität von adhärenenten PC12-Zellen und der Einfluss von NGF

Um eventuelle Unterschiede in der zeitlichen Expression des Reportergens in den verschiedenen Phänotypen auszuschließen, transfizierten wir PC12-Zellen im Pool am Tag 0 und säten sie anschließend auf Kollagen und auf Kollagen mit NGF aus. Die Zellen differenzierten sich 2 Tage und wurden dann der Hypoxie ausgesetzt. Nach einer Hypoxie von 24 Stunden wurde die HIF-1-Aktivität gemessen.

Die HIF-1-Aktivität wurde nach folgendem Versuchschema gemessen:

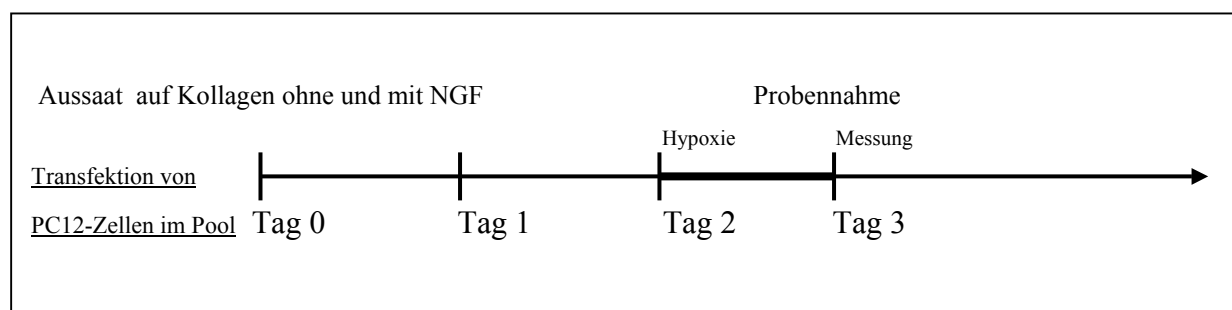


Abbildung 32: Versuchsablauf der Transfektion von PC12-Zellen im Pool und anschließender Aussaat auf Kollagen (KOLL-AD) und auf Kollagen mit NGF (KOLL-AD-NGF). Zu jedem Versuch wurde parallel noch eine Kontrollgruppe angesetzt, die sich lediglich durch die fehlende Hypoxieexposition unterschied.

In Normoxie zeigen sich keine Unterschiede in der HIF-1-Aktivität. Die Hypoxie erhöht in beiden Kulturen die HIF-1-Aktivität. Allerdings erkennt man in den verschiedenen Phänotypen eine unterschiedliche HIF-1-Aktivität nach Hypoxieexposition: Die adhärenen PC12-Zellen auf Kollagen mit NGF behandelt, zeigen eine signifikante Verminderung der HIF-1-Aktivität im Vergleich zu den auf Kollagen gewachsenen adhärenen PC12-Zellen ohne NGF. In der Abbildung 33 ist die HIF-1-Aktivität der im Pool transfizierten PC12-Zellen dargestellt.

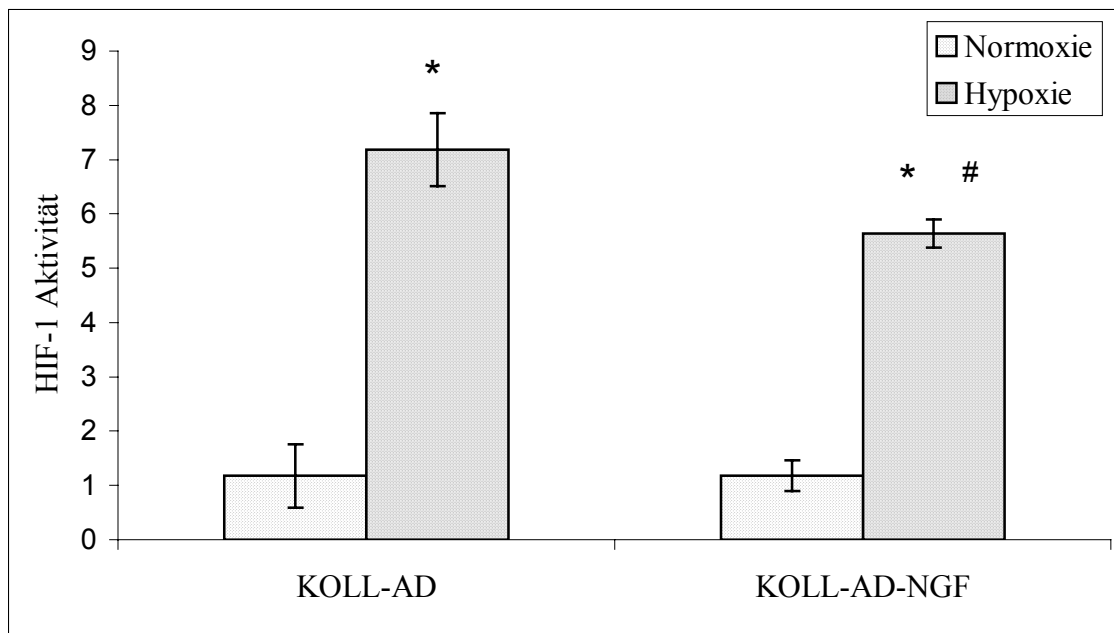


Abbildung 33: Adhärenen PC12-Zellen auf Kollagen (KOLL-AD) und auf Kollagen mit NGF (KOLL-AD-NGF), im Pool transfiziert. Dargestellt ist die HIF-1-Aktivität in Normoxie und nach 24 Stunden Hypoxieexposition. $n = 3$ unabhängige Versuche. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. * = $p < 0,01$ im Unterschied zur Normoxie. # = $p < 0,001$ im Vergleich zu KOLL-AD.

4.4 Antisense HIF-1 alpha

Um die Beziehung zwischen Zelltod und HIF-1-Aktivität weiter zu charakterisieren, wählten wir ein alternatives Modell: Die in der Arbeitsgruppe Prof. Gross generierten Zellklone, die mit Antisense HIF-1 alpha permanent transfiziert wurden. Durch die Analyse der Antisense-Zelllinie mit einer verminderten HIF-1-Aktivität nach Hypoxieexposition, erhofften wir uns Informationen über den spezifischen Einfluss von HIF-1 auf den Zelltod. Es standen drei Zelllinien zur Verfügung: Ein mit pCMV transfizierter stabiler Klon (CMV) als Kontrolle und zwei mit Antisense HIF-1 alpha transfizierte Klone (19P und 19T).

4.4.1 Transfektionseffizienz der Antisense-Zelllinien

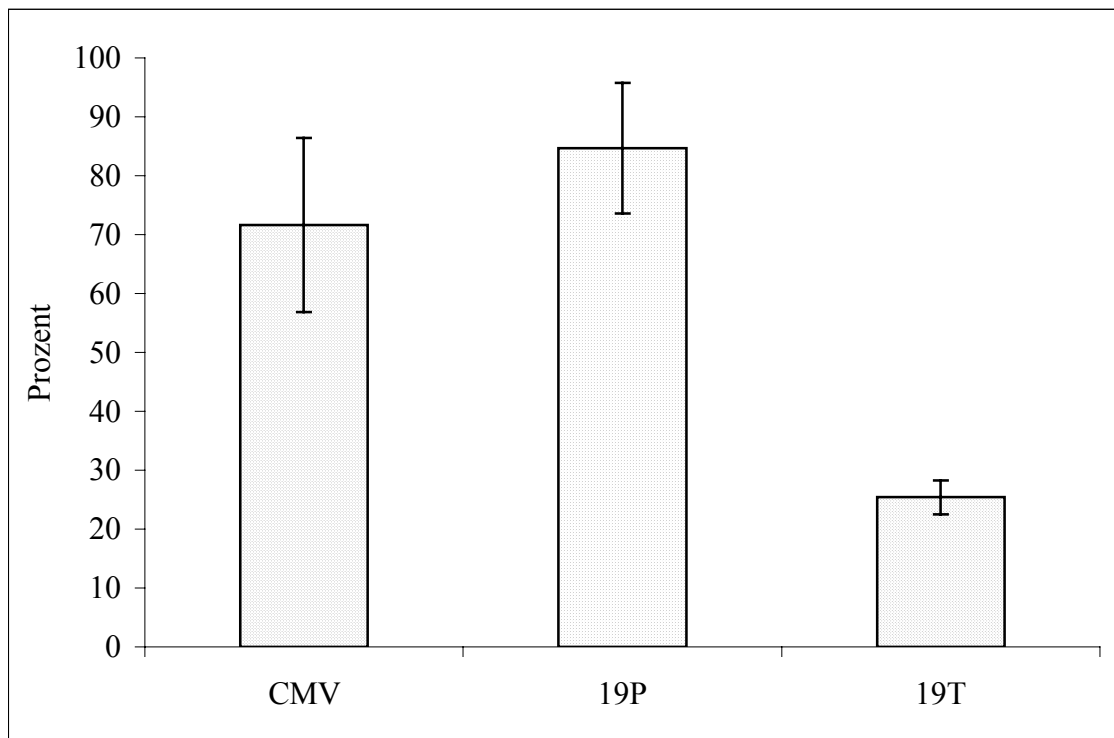


Abbildung 34: Expression von pGFP der Zelllinien CMV, 19P und 19T. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der mit pGFP transfizierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp (= 100%). 19P und 19T als transgene PC12-Zelllinien mit Antisense-Konstrukt und die Zelllinie CMV als transgene Zelllinie ohne Antisense-Konstrukt. n = 4, Mittelwert \pm SEM.

Wir verglichen zwei Antisense-Zelllinien und eine Kontrollzelllinie (Abbildung 34). Die Transfektionseffizienz wurde mittels pGFP untersucht und im Vergleich zum Wildtyp (100%) dargestellt. Die Transfektionseffizienz entspricht der Anzahl der mit pGFP transfizierten Zellen. Die transgene Antisense-Zelllinie 19P zeigt eine Transfektionseffizienz von ca. 85 % im Vergleich zum Wildtyp. Die transgene Zelllinie 19T ließ sich kaum transfizieren. Nur ca. 25 % der Zellen wurden im Vergleich zum Wildtyp transfiziert. Die transgene CMV Kontrollzelllinie zeigt eine ähnliche Transfektionseffizienz wie die 19P Zelllinie: Ca. 70 % der Zellen wurden transfiziert. Aufgrund der vergleichbaren Transfektionseffizienz entschieden wir uns, für die weiteren Versuche, den stabil mit Antisense HIF-1 alpha transfizierten Zellklon 19P zu verwenden. Leclere zeigte, dass dieser Zellklon eine deutlich verminderte HIF-1-Aktivität aufwies (Leclere, 2000).

4.4.2 Variabilität der HIF-1-Aktivität der Antisense-Zelllinie

Die aufgetaute Antisense-Zelllinie erwies sich als sehr variabel in der berechneten HIF-1-Aktivität. In Normoxie war die HIF-1-Aktivität der Antisense-Zelllinie lediglich in einigen

Versuchen geringer als in der CMV- und WT-Zelllinie. Abb. 35 zeigt die mit diesem Zellklon durchgeführten Versuche, wobei als Kontrolle die Wildtyp-Zelllinie immer mitbestimmt wurde.

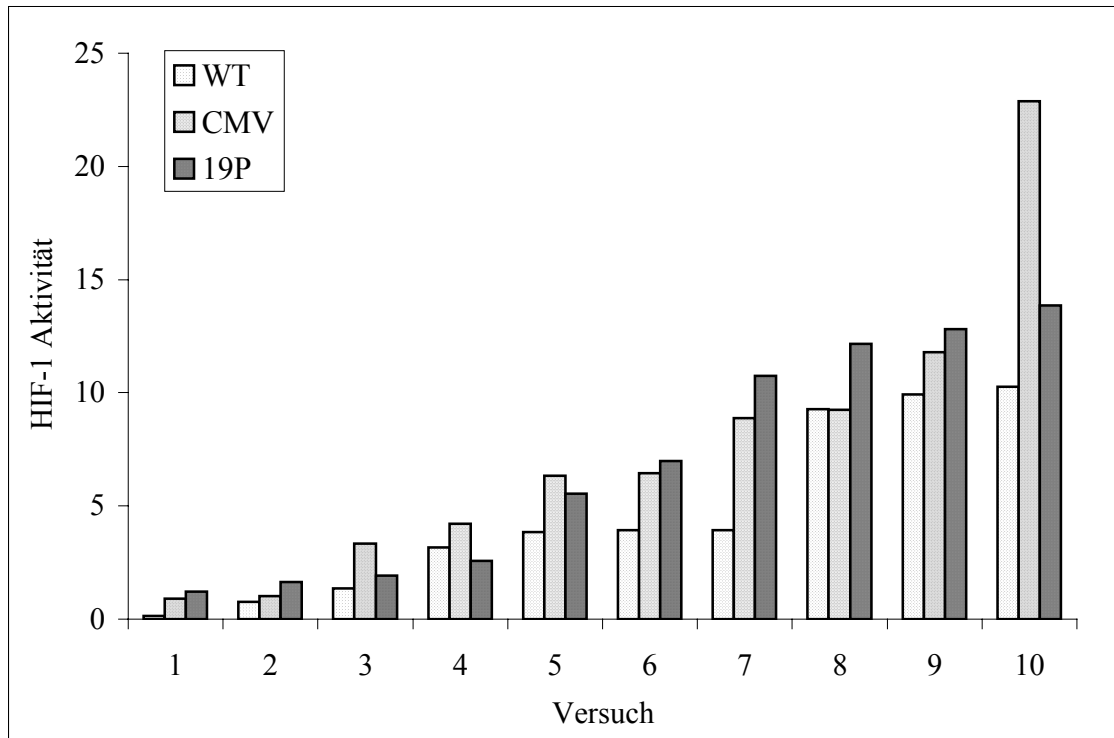


Abbildung 35: HIF-1-Aktivität von verschiedenen Passagen der 19P Antisense-Zelllinie nach 24 Stunden Hypoxieexposition. Dargestellt sind 10 verschiedene Versuche, der Größe nach sortiert.

Die Varianz der HIF-1-Aktivität nach Hypoxieexposition ist groß. In einigen Versuchen ist die HIF-1-Aktivität der Antisense-Zelllinie 19P im Vergleich zur CMV-Kontrollzelllinie vermindert (Versuche 3, 4, 5 und 10). In anderen Versuchen ist die HIF-1-Aktivität der Antisense-Zelllinie 19P höher als die der Kontrollzelllinie CMV (Versuch 1, 2, 6, 7, 8 und 9).

4.4.3 HIF-1-Aktivität der Zelllinien WT, CMV, 19P in Suspension

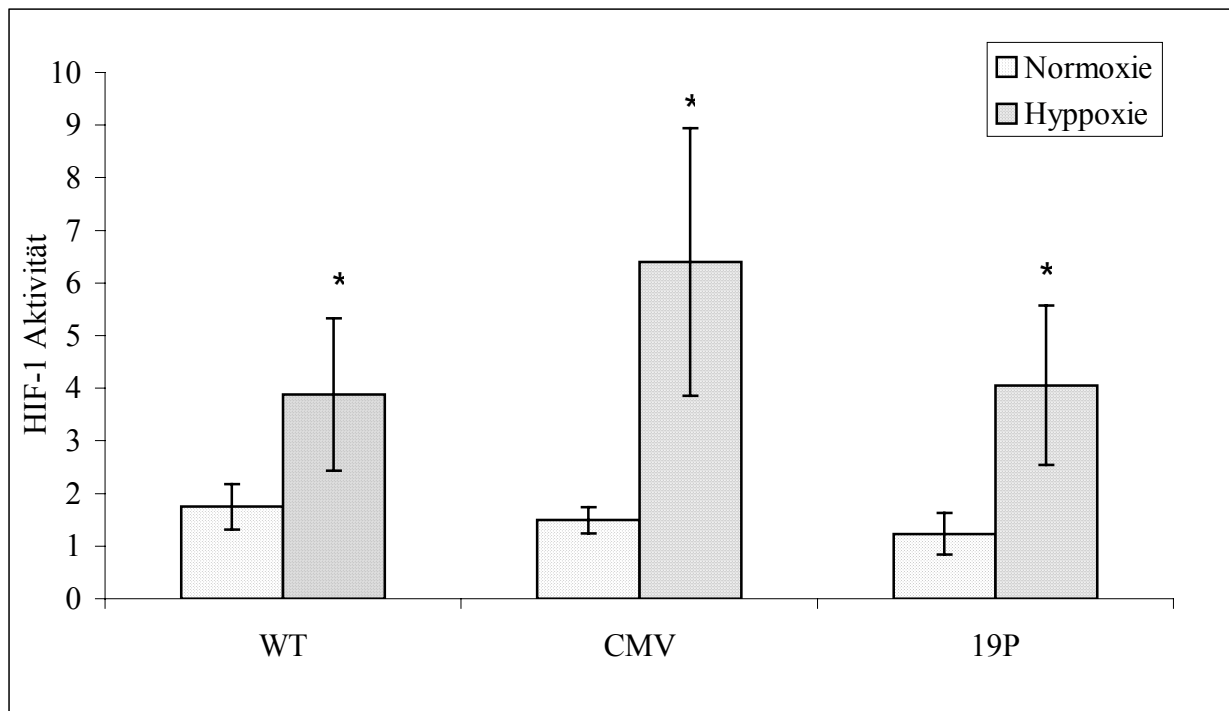


Abbildung 36: Die HIF-1-Aktivität (pHBE/pGL3) in den Zelllinien WT, CMV und 19P in Normoxie und nach 24 Stunden Hypoxieexposition. Dargestellt ist der Mittelwert von n=10 mit SEM. * = p < 0,01 im Vergleich zur Normoxie.

Die Mittelwerte der durchgeführten Versuche ergaben keine Verminderung der HIF-1-Aktivität in der Antisense-Zelllinie 19P nach einer Hypoxieexposition (Abbildung 36). Signifikante Unterschiede ergeben sich lediglich im Vergleich zur Normoxie.

4.4.4 HIF-1-Aktivität der Zelllinien WT, CMV, 19P adhären auf Kollagen

Die HIF-1-Aktivität der PC12-Zellen auf Kollagen gleicht denen der PC12-Zellen in Suspension. Es gibt keine signifikante Verminderung der HIF-1-Aktivität der Antisense-Zelllinie im Vergleich zur Kontrollzelllinie CMV (Tabelle 2). Signifikante Unterschiede ergeben sich lediglich im Vergleich zur Normoxie.

Tabelle 2: HIF-1-Aktivität (pHBE/pGL3) in KOLL-AD-Kulturen in den Zelllinien WT, CMV und 19P in Normoxie und nach 24 Stunden Hypoxieexposition

KOLL-AD	WT	CMV	19P
Kontrolle	2,9 (± 0,6)	2,7 (± 0,6)	2,7 (± 0,5)
Hypoxie	9,6 (± 2,3) *	6,3 (± 1,2) *	6,2 (± 1,6) *

Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM von n=10. * = p < 0,01 im Vergleich zur Normoxie.

4.4.5 HIF-1-Aktivität der Zelllinien WT, CMV, 19P adhären auf Kollagen mit NGF

Auch die HIF-1-Aktivität der PC12-Zellen auf Kollagen mit NGF gleicht denen der PC12-Zellen in Suspension. Es gibt keine signifikante Verminderung der HIF-1-Aktivität der Antisense-Zelllinie im Vergleich zur Kontrollzelllinie CMV (Tabelle 3).

Tabelle 3: HIF-1-Aktivität (pHBE/pGL3) in KOLL-AD-NGF-Kulturen in den Zelllinien WT, CMV und 19P in Normoxie und nach 24 Stunden Hypoxieexposition

KOLL-AD-NGF	WT	CMV	19P
Normoxie	1,5 (\pm 0,7)	1,5 (\pm 0,3)	1,5 (\pm 0,36)
Hypoxie	4,3 (\pm 0,1) *	4,0 (\pm 1,8) *	4,5 (\pm 0,8) *

Dargestellt ist der Mittelwert von $n=10 \pm$ SEM. * = $p < 0,01$ im Vergleich zur Normoxie.

4.4.6 Antisense-Einzelzellklone

Unter der Annahme, dass auch die Antisense-Zelllinie 19P heterogen ist und Zellen mit unterschiedlicher HIF-1-Aktivität enthält, wurden die Zellen in 96-Well-Platten vereinzelt, vermehrt und anschließend die HIF-1-Aktivität in den Antisense-Subklonen gemessen.

4.4.6.1 HIF-1-Aktivität eines Antisense-Einzelzellklons

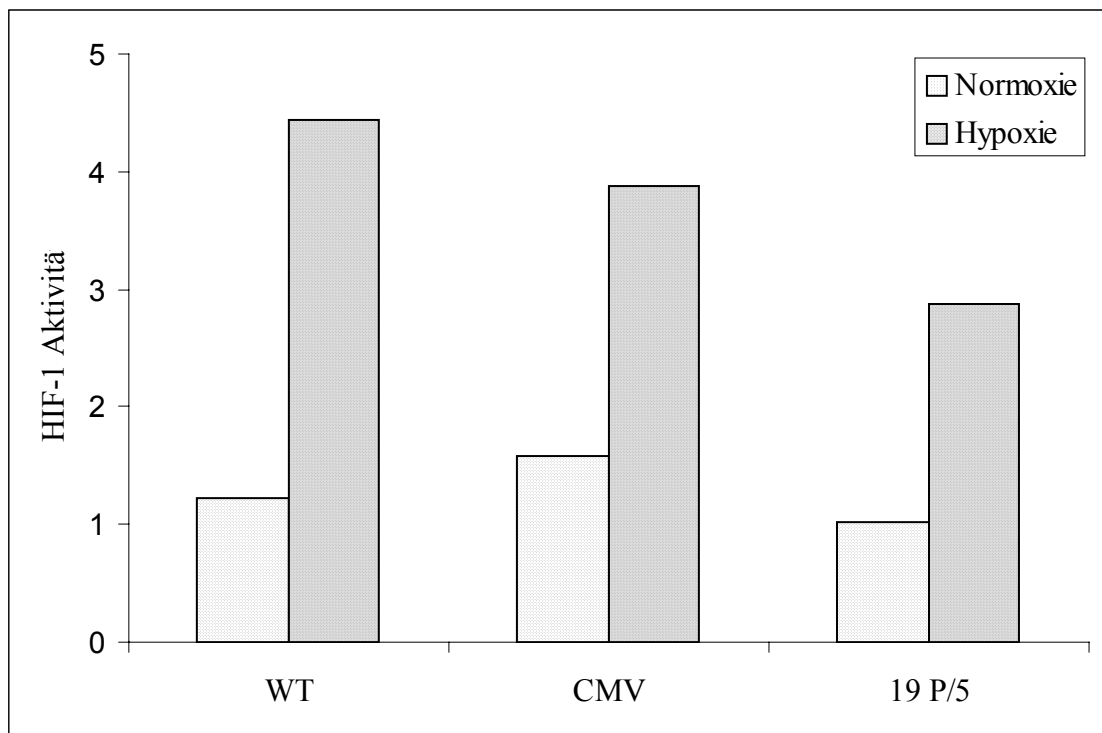


Abbildung 37: HIF-1-Aktivität (pHBE/pGL3) in den Zelllinien WT, CMV und dem Einzelzellklon 19P/5 in Normoxie und nach 24 Stunden Hypoxieexposition.

Abbildung 37 zeigt die HIF-1-Aktivität eines dieser Subklone (19 P/5). Ca. 30 % ist die HIF-1-Aktivität gegenüber der CMV und der WT-Zelllinie vermindert.

4.4.6.2 Zelltod des Antisense-Einzelzellklons

PC12-Zellen aus der gleichen Kultur des Antisense-Einzelzellklons, bei denen die verminderte HIF-1-Aktivität in Abbildung 37 mittels Reportergenen dargestellt ist, wurden in einem Durchflusszytometer mit Doppelfärbung durch Annexin-V und Propidium-Jodid gemessen.

Die Analyse der Durchflusszytometrie in Abbildung 38 im Punktehistogramm dargestellt, zeigt die Verteilung der Annexin-V und Propidium-Jodid Färbung der CMV-Zelllinie. Es ist zu erkennen, dass in Normoxie a) die Population ungefärbter Zellen 83,1 % beträgt. PI+ sind 3,7 % der Zellen. Lediglich 1 % der Zellen sind ANN+.

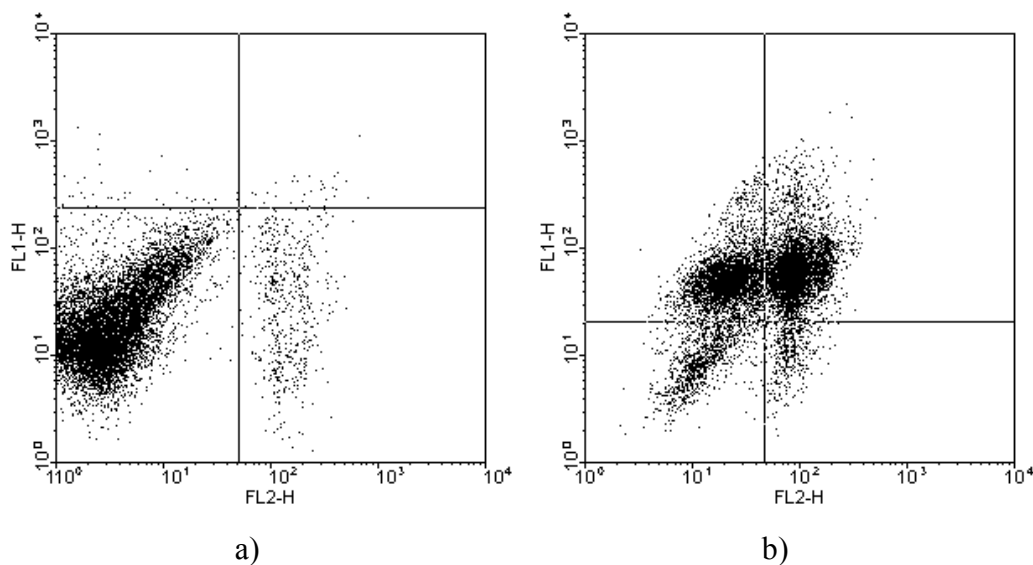


Abbildung 38: Punktehistogramm von PC12-Zellen der Kontrollzelllinie CMV in Suspension. a) Normoxie und b) nach einer Hypoxieexposition von 72 Stunden. Dargestellt ist ein exemplarischer Versuch mit einer Doppelfärbung mit Annexin-V und PI. FL1 stellt die grüne Fluoreszenz (ANN) dar und FL2 die rote Fluoreszenz (PI).

Eine Hypoxieexposition von 36 Stunden bewirkt keine messbare Zellschädigung (nicht dargestellt). Nach 72 Stunden Hypoxieexposition (b) erkennt man einen deutlichen Einfluss der Hypoxie: 9,4 % der Zellen sind ungefärbt, ANN+ sind 32 % der Zellen und ANN+/PI+ sind 53,8 % der Zellen. Nur 4,8 % der Zellen sind PI+.

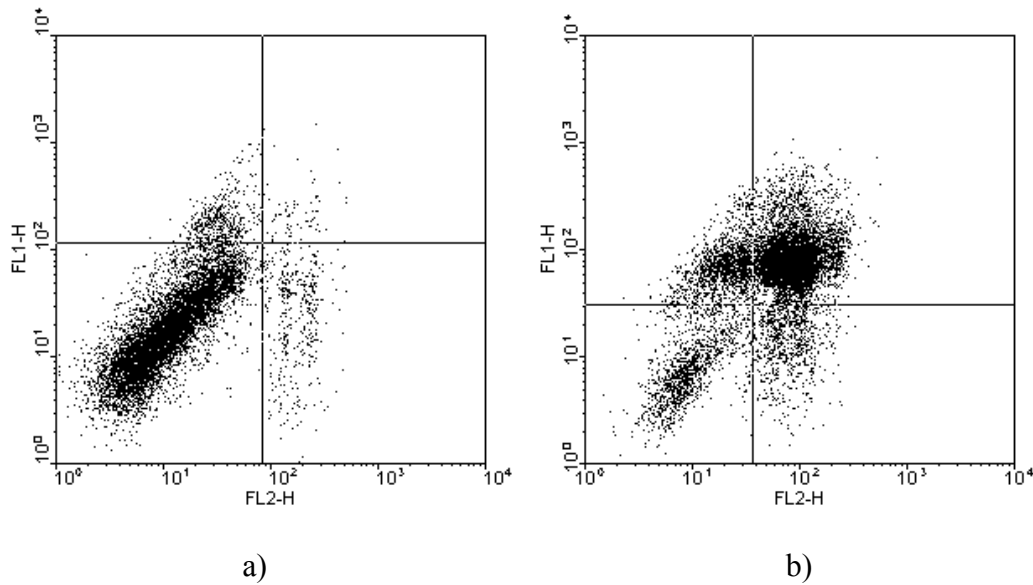


Abbildung 39: Punktehistogramm von PC12-Zellen des Antisense-Subklons 19P/5 in Suspension in Normoxie a) und nach einer Hypoxieexposition von 72 Stunden b). Dargestellt ist ein exemplarischer Versuch mit einer Doppelfärbung mit Annexin-V und PI. FL1 stellt die grüne Fluoreszenz (ANN) dar und FL2 die rote Fluoreszenz (PI).

Die Durchflusszytometrie (Abbildung 39) zeigt die Hypoxie-induzierte Reaktion des Antisense-Subklons 19P/5. Man erkennt, dass in der Normoxie (a) eine große Population ungefärbter Zellen vorhanden ist. Der Anteil der ungefärbten Zellen macht 87,7 % aus. 3,8 % der Zellen sind PI+ und im rechten unteren Quadranten zu erkennen. 7,4 % der Zellen sind ANN+.

Nach der Hypoxieexposition von 72 Stunden (b) wird eine deutliche Veränderung sichtbar:

14,1 % der Zellen sind ungefärbt, lediglich ANN+ sind 16,4 % der Zellen und ANN+/PI+ sind 59,8 % der Zellen. Nur 9,7 % der Zellen sind PI+. Signifikante Unterschiede zwischen der CMV und 19P Zelllinie sind nicht zu auszumachen.

4.5 Einfluss der Temperatur

Als ein weiteres Modell zur Aufklärung der Beziehung zwischen Zelltod und HIF-1-Aktivität wählten wir den Einfluss der Hypo- bzw. Hyperthermie auf den Zelltod und die HIF-1-Aktivität von PC12-Suspensionszellen. Es ist bekannt, dass Hypothermie protektiv auf den Zelltod wirkt und Hyperthermie den Zelltod fördert. Wir entschieden uns für eine Hypothermie von 32°C, einer 36°C-Kontrollgruppe und einer Hyperthermie von 42°C. In Abbildung 40 ist der Versuchsaufbau dargestellt.

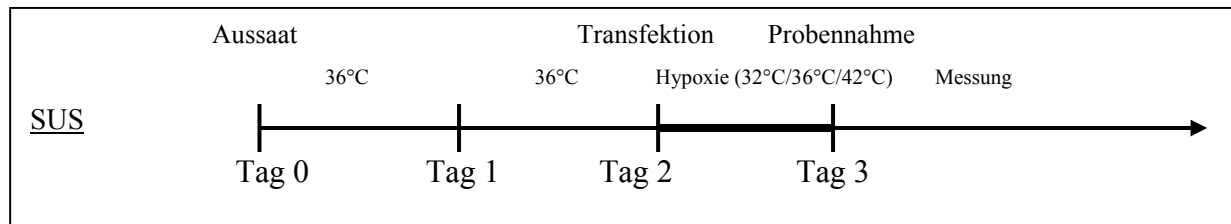


Abbildung 40: Versuchsaufbau der PC12-Zellen mit unterschiedlicher Temperaturexposition. Die PC12-Zellen wurden in Suspension ausgesät und am Tag 2, unmittelbar vor der Hypoxie, transfiziert. Anschließend wurden die Zellen bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Die Hypoxiedauer betrug 36 Stunden. Zu jedem Versuch wurde eine Kontrollgruppe angesetzt, die sich lediglich durch die fehlende Hypoxieexposition unterschied.

4.5.1 Apoptose und Nekrose nach Hypoxieexposition

Mittels Durchflusszytometrie und einer Doppelfärbung mit Annexin-V und Propidium-Jodid, untersuchten wir den Einfluss der Temperaturbedingungen bei einer Hypoxiedauer von 72 Stunden auf Apoptose und Nekrose.

Tabelle 4: Durchflusszytometrie von PC12-Suspensionszellen in Normoxie und nach 72 Stunden Hypoxie in 32°C, 36°C und 42°C.

32°C	ANN+ und ANN+/PI+	PI+	Ungefärbt
Kontrolle	3,4 (± 1,3)	4,2 (± 2,11)	92,3 (± 2,5)
Hypoxie	5,7 (± 5,4)	5,6 (± 1,3)	88,7 (± 2,4)

36°C	ANN+ und ANN+/PI+	PI+	Ungefärbt
Kontrolle	3,8 (± 1,8)	7,8 (± 2,6)	88,3 (± 1,8)
Hypoxie	11,3 (± 7,1) #	5,34 (± 1,7)	82,9 (± 4,3)

42°C	ANN+ und ANN+/PI+	PI+	Ungefärbt
Kontrolle	13,5 (± 1,5) *#	7,3 (± 3,1)	65,4 (± 10,5)
Hypoxie	6,9 (± 11,2)	9,9 (± 4,09)	73,5 (± 8,9)

Doppelfärbung mit Annexin-V und Propidium-Jodid. n = 6, Mittelwert ± SEM. * = p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle bei 32°C, # = p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle bei 36°C.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit Doppelfärbung von Annexin-V und Propidium-Jodid in Normoxie und nach 72 Stunden Hypoxie dargestellt, wobei die ANN+ und ANN+/PI+ zusammen gefügt wurden. Bei 32°C kommt es zu keinen statistisch signifikanten Veränderungen. Die Anzahl der ANN+ und ANN+/PI+ Zellen und die Anzahl der PI+ Zellen

liegen in Normoxie und Hypoxie bei 5%. Ca. 90% der Zellen bleiben ungefärbt. Bei den PC12-Zellen in der Kontrollgruppe bei 36°C steigen die Werte von ANN+ und ANN+/PI+ Zellen von 3,8 in Normoxie auf 11,3 in Hypoxie signifikant an. Die Anzahl von PI+ Zellen bleibt unbeeinflusst. Bei 42°C lässt sich ein Temperatureinfluss bereits in der Kontrolle vermuten: Die ANN+ und ANN+/PI+ Zellen steigen von 3,8 bei 36°C in Normoxie auf 13,5 bei 42°C in Normoxie an. Ein Einfluss der Hypoxie innerhalb der Kultur bei 42 °C ist statistisch nicht zu erkennen.

4.5.2 Kontrollvektor pGL3 bei PC12-Zellen in Suspension und der Einfluss der Temperatur

Wie bereits dargestellt, wird die Expression des Kontrollvektors pGL3 durch NGF und Hypoxie beeinflusst. Deshalb untersuchten wir auch den Einfluss der Temperatur auf die Expression des pGL3-Vektors. An Tabelle 5 wird deutlich, dass in Normoxie die Expression mit steigender Temperatur verringert wird. Auch in Hypoxie ist dieser Effekt erkennbar: Die Expression von pGL3 sinkt von 31,4 RLE bei 32°C auf 5,6 RLE bei 42°C.

Tabelle 5: Einfluss der Temperatur auf die Expression des Kontrollvektors pGL3 in PC12-Zellen in Suspension.

Temperatur	Normoxie	Hypoxie
32°C	96,7 ± 26,7	31,4 ± 9
36°C	69 ± 15,5	27,7 ± 5,2
42°C	9,6 ± 1,6* #	5,6 ± 1,3* #

Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM der RLE. n = 7 unabhängige Versuche. * = p < 0,01 im Vergleich zu 32°C. # = p < 0,001 im Vergleich zu 36°C. Die PC12-Zellen wurden am Tag 0 in Suspension ausgesät. Die Transfektion fand am Tag 2 vor der Hypoxie und Temperaturexposition statt.

4.5.3 Abhängigkeit der HIF-1-Aktivität von der Temperatur

Die HIF-1-Aktivität von PC12-Wildtyp-Zellen, die bei verschiedenen Temperaturen einer Hypoxie ausgesetzt wurden, ist in Abbildung 41 dargestellt. Mit steigender Temperatur sinkt die HIF-1-Aktivität. Die Kultur bei 32°C zeigt eine ähnliche HIF-1-Aktivität wie bei 36°C. Die HIF-1-Aktivität der Kultur von 42°C ist signifikant geringer als die der Kultur von 32°C und die der Kultur von 36°C.

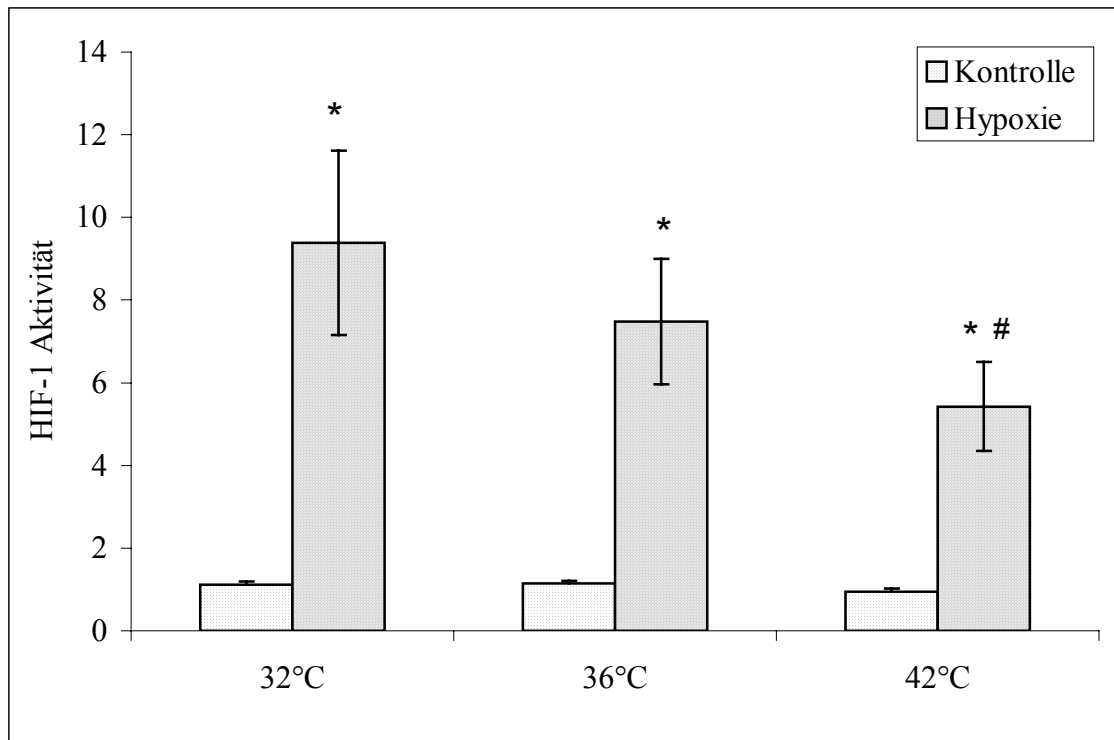


Abbildung 41: Dargestellt ist die HIF-1-Aktivität in PC12-Zellen nach Hypoxieexposition bei unterschiedlichen Temperaturen in Normoxie und nach 24 Stunden Hypoxie. $n=7$, Mittelwert \pm SEM. * = $p < 0,01$ im Vergleich zu Normoxie. # = $p < 0,01$ im Vergleich zu 32°C und 36°C.

5 Diskussion

5.1 Zelltod

5.1.1 Einfluss von Hypoxie auf den Zelltod

In unseren Versuchen zeigt die durchflusszytometrische Analyse der Zellen einen durch Hypoxie induzierten Anstieg des Anteils von ANN+ und ANN+/PI+ Zellen. Nach Walton et al. (1997) repräsentieren Annexin-V positive Zellen früh-apoptotische Zellen. Simultane Färbung von Annexin-V und Propidium-Jodid repräsentieren Zellen später Phasen der Apoptose und nekrotische Zellen (Walton et al., 1997). Ähnlich wie in vorhergehenden Untersuchungen fanden wir, dass Hypoxie Apoptose und Nekrose parallel induziert (Yoshimura et al., 1998).

Interessanterweise zeigt die Methode der Durchflusszytometrie im Vergleich zur Analyse der Enzymaktivitäten, die für die Messung des Zellschadens benutzt wurden, ein unterschiedliches Ausmaß und eine unterschiedliche Qualität von Hypoxie-induziertem Zellschaden. Eventuell ist der Grund für diese Unterschiede der Zeitpunkt der Bewertung des Zelltodes nach der Hypoxie, bedingt durch verschiedene Färbemethoden. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen vorangegangene Untersuchungen von Keilhoff und Wolf (1993), die zeigten, dass Fluoreszenz-Labeling von Zellen nicht parallel zur LDH-Freisetzung läuft.

5.1.2 Einfluss von NGF auf den Zelltod

Wie seit langem bekannt, bewirkt NGF eine Differenzierung von PC12-Zellen. Die Wirkung von NGF auf den Zelltod hängt offensichtlich von den jeweiligen Versuchsbedingungen ab. Unsere Versuche zeigen einen Anstieg der Hypoxievulnerabilität der PC12-Zellen nach Behandlung mit NGF im Vergleich zu unbehandelten PC12-Zellen. Verursacht wird diese erhöhte Hypoxievulnerabilität wahrscheinlich durch NGF vermittelte Mechanismen, wie die Modifizierung der Glutamat-Rezeptor-Expression und die veränderte Wirkung von freien Radikalen (Sato et al., 1999). In Neuronen wird der apoptotische Zelltod durch autonome Mechanismen in der Zelle kontrolliert, die durch Neurotrophine, wie den Nervenwachstumsfaktor, beeinflusst werden (Edwards und Tolkovsky, 1994; Mesner et al., 1992). Dabei kommt es zu komplexen Wechselwirkungen zwischen der Signaltransduktion und pro-apoptotischen Faktoren wie Mitgliedern der bcl-2 Familie (z.B. Bax) und den Mitochondrien (Crompton, 2000). Es wurde allerdings auch gezeigt, dass das anti-apoptotische Protein bcl-2 durch NGF hochreguliert wird (Kato et al., 1996). In unserem Modell scheint eine mögliche Hochregulation durch NGF nicht ausreichend zu sein, um PC12-Zellen vor dem Hypoxie-induzierten Zelltod zu schützen.

Es ist bekannt, dass die Differenzierung von PC12-Zellen eng assoziiert ist mit unterschiedlicher Genexpression. Beispielsweise kommt es zu einer Hochregulation des NGF-Rezeptors p75 und einer Hemmung der Expression des Proliferation-assoziierten-Genes (PAG) und des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-1 (Satoh und Kuroda, 2000), was möglicherweise mit dem Hypoxie-induzierten Zelltod in mit NGF behandelten Zellen zusammenhängt. Zusätzlich zu den trophischen Funktionen, die durch den Trk-A-Rezeptor vermittelt werden, wurde auch gezeigt, dass NGF, an p75 bindend, neuroprotektiv wirken kann (Kume et al., 2000).

5.1.3 Einfluss von Temperatur auf den Zelltod

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die Temperatur einen großen Einfluss auf den Zelltod hat. Durch eine verringerte Körpertemperatur sinkt der Bedarf an Sauerstoff und Glukose. Adaptativ wird die neuronale Aktivität durch inhibitorische Neuromodulatoren wie Gamma-amino-butyric-acid (GABA) vermindert (Nilsson und Lutz, 1991). Aus der Literatur ergeben sich zahlreiche Hinweise, sowohl für eine vermehrte Nekrose, als auch für eine vermehrte Apoptose nach hyperthermer Exposition (Busto et al., 1987; Khan und Brown, 2002). Es wird beschrieben, dass Langzeit-Hyperthermie zu Nekrose und Kurzzeit-Hyperthermie zu einer vermehrten Apoptose führt.

Aus unseren Versuchen lässt sich erkennen, dass eine Hyperthermie von 42°C im Vergleich zur Kontrolle (36°C) und zur Hypothermie (32°C), zu einem Anstieg der ANN+ und ANN+/PI+ PC12-Zellen führt (Tabelle 4). Die ANN+ und ANN+/PI+ PC12-Zellen repräsentieren wahrscheinlich die früh- und spät-apoptotischen PC12-Zellen. Interessanterweise kommt es in der Hypoxie zu keinem Anstieg der ANN+ und ANN+/PI+ Zellen. Es scheint ein Hypoxie-induzierter Effekt zu existieren, der in unseren Versuchsbedingungen die Apoptose verhindert. In der Literatur wird nur beschrieben, dass durch eine Hyperthermie von 42°C in retinalen Ganglienzellen die Expression von 72-kDa Heat-shock-Protein erhöht wird und die Toleranz gegenüber einer Hypoxieexposition steigt und es zu weniger exitotoxischen Schäden kommt (Caprioli et al., 1996). Turman und Rosenfeld berichten gegenteilig, dass eine Überexpression von Heat-shock-protein 70 in der Lage ist, Zellen vor einer Hyperthermie zu schützen, nicht aber vor einer Hypoxie (Turman und Rosenfeld, 1999).

Bedeutend für den Zelltod unter unseren Kulturbedingungen sind die während einer Hypoxieexposition vermehrt produzierten sauren Metaboliten, welche zu einer Verminderung des intrazellulären pH-Wertes führen. Diese intrazellulären Bedingungen bewirken eine verstärkte Thermosensitivität (Lyons und Song, 1995; Ohtsubo et al., 2000).

Des weiteren wird beschrieben, dass physiologischer Stress, wie Hyperthermie, p53 aktiviert (Guan et al., 2002). Über pro-apoptotische Faktoren (z.B. Bax) kommt es durch eine Aktivierung von Caspase-3 zu einer vermehrten Hyperthermiesensitivität und schließlich zur Apoptose (Ohnishi und Ohnishi, 2001; Yonezawa et al., 2002). Interessanterweise wird in der Literatur beschrieben, dass hyperthermische Apoptose p53-Gen abhängig, aber auch p53-Gen unabhängig, ablaufen kann (Goto et al., 1999). Es wird auch berichtet, dass in humanen kolorektalen Tumorzellen Hyperthermie (42°C) -induzierte Apoptose durch p53 vermindert wird und dass bcl-2 und Bax nicht in die Induktion der Apoptose involviert sind (Ohtsubo et al., 2000).

5.2 HIF-1-Aktivität

5.2.1 Transfektionseffizienz

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wählten wir den Vektor pGFP. Bei genauer Betrachtung ist ein Einfluss der verschiedenen Versuchsbedingungen auf die Transfektionseffizienz zu erkennen. In Normoxie zeigt der Vektor pGFP in der SUS-Kultur eine höhere Transfektionseffizienz als in der KOLL-AD-NGF-Kultur. Die SUS-Kultur lässt sich leichter mit pGFP transfizieren. Dieses Bild ergibt sich nach ca. 4 Tagen. Am Tag 1 kann noch keine Aussage über Unterschiede in der Transfektionseffizienz gemacht werden (Abbildung 18). Aus der Transfektion mit dem Vektor pGFP lässt sich schließen, dass 5-10 % der Zellen mit dem Transfektionsverfahren von TransFast transfiziert werden und das Verfahren ausreichend für die Messung der Luciferase und die Beurteilung der HIF-1-Aktivität ist. Aus der unterschiedlichen Transfektionseffizienz der einzelnen Phänotypen muss man die Schlussfolgerung ziehen, bei der Berechnung der HIF-1-Aktivität immer auf den Kontrollvektor pGL3 zu normieren, um einen verfälschenden Einfluss der Transfektionseffizienz zu umgehen.

5.2.2 Einfluss von NGF und Hypoxie auf den Kontrollvektor pGL3

Die Genexpression der Vektoren wird von den unterschiedlichen Versuchsbedingungen beeinflusst. Wie besonders aus der Tabelle 1 ersichtlich, beeinflusst NGF die Expression des Vektors pGL3. In Normoxie erhöht NGF die Expression des Vektors pGL3 mit steigender NGF-Konzentration. In Hypoxie scheint NGF dagegen die Expression zu vermindern. Am wahrscheinlichsten führt eine Interaktion der Hypoxie mit NGF zu einer Verminderung der SV40-Promotor-Aktivität und folglich zur Verminderung der pGL3-Vektor-Aktivität. Die Verminderung der Genexpression durch Hypoxie scheint von den jeweiligen Versuchsbedingungen abzuhängen.

Wahrscheinlich beeinflusst die Hypoxie die bei einer Transfektion stattfindende Vektorfreisetzung aus Lipidvesikeln in das Zytoplasma und deren Weg in den Zellkern. Der limitierende Schritt im intrazellulären DNA-Trafficking scheint der Eintritt der DNA in den Zellkern, hauptsächlich durch Veränderungen der nukleären Membran während der Zellteilung zu sein (Zauner et al., 1999). Allerdings sieht man auch bei Transfektionen im Pool und erst 2 Tage später folgender Hypoxie (Absolutwerte nicht dargestellt) eine Verminderung des pGL3-Vektors durch die Hypoxie.

Einen möglichen Einfluss der signifikant unterschiedlichen Proliferationsrate in unbehandelten und NGF-behandelten PC12-Zellen kann man ausschließen, da der pGL3-Vektor in NGF-behandelten Zellen, die eher eine verminderte Proliferationsrate zeigen, stärker exprimiert wird. Zellteilungsprozesse können somit nicht für die beobachteten phänotypischen Unterschiede in der Expression der Reportergene verantwortlich sein.

5.2.3 Einfluss von Temperatur auf den Kontrollvektor pGL3

Die Temperatur hat ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die Expression des Kontrollvektors pGL3. Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, sinkt die Vektorexpression mit steigender Temperatur, sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen. In der Literatur wird besonders von einem Anstieg der Promotoraktivität des Heat-Shock-Protein Promotors berichtet (Braiden et al., 2000; Gerner et al., 2000). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wird auch in der Literatur beschrieben, dass Hypothermie die Expression von einem Luciferase-Reporter-Gen verstärkt (Chevrier-Miller et al., 1996).

5.2.4 Einfluss von NGF auf die HIF-1-Aktivität und mögliche Mechanismen

Unsere Versuche zeigen, dass unter verschiedenen Bedingungen die HIF-1-Aktivität vermindert ist: Das Primen von PC12-Zellen mit NGF in Suspension vermindert die HIF-1-Aktivität proportional zur NGF-Konzentration (Abbildung 31). Dies gilt auch für PC12-Phänotypen, die adhären wachsen, allerdings in geringerem Ausmaß. Bei NGF-differenzierten PC12-Zellen war die HIF-1-Aktivität gegenüber den undifferenzierten PC12-Zellen signifikant vermindert (Abbildung 33).

Verschiedene Mechanismen für die NGF-bedingte Verminderung von HIF-1 sind denkbar:

1. Eine verminderte Bindungskapazität von HIF-1 an die Promotorregion von Reportergenen, ein verstärkter Abbau von HIF-1 durch Ubiquitinierung oder eine Heterodimerisierung mit Partnern von NGF-induzierten Transkriptionsfaktoren sind denkbar. Der HIF-1 alpha Level wird durch die Ubiquitinierung reguliert (Kallio et al.,

1999). Da gezeigt wurde, dass NGF die Ubiquitinierung aktiviert (Obin et al., 1999), ist ein vermehrter Abbau von HIF-1 durch Ubiquitinierung oder durch Heterodimerisierung mit Partnern von NGF-induzierten Transkriptionsfaktoren denkbar.

2. Eine weitere mögliche Erklärung für den inhibierenden Effekt von NGF ergibt sich aus der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren: Nukleärer Faktor- κ B (NF- κ B) und dem aktivierendem Protein-1 (AP-1) (Maggirwar et al., 2000). Der Nukleäre Faktor- κ B kann direkt um die Bindung von dem sogenannten Coaktivator-p300 konkurrieren. Dieser transkriptionelle Coaktivator-p300 interagiert mit HIF-1 alpha (Arany et al., 1996) und ist eventuell an dem inhibierenden Effekt von NGF auf die Hypoxie-induzierte HIF-1 Aktivierung beteiligt.
3. Eine weitere Studie zeigte, dass Zytokine die Bindung von HIF-1 in humanen Leberzelllinien stimulieren, was eine Interaktion zwischen Zytokinen und Transkriptionsfaktoren und folglich noch weiteren Einflussfaktoren in der Regulation der HIF-1-Aktivität vermuten lässt (Hellwig-Burgel et al., 1999).
4. Ein großer Teil der Reaktionen auf Hypoxie beruht auf der Stabilisierung von HIF-1 mRNA und dem HIF-1 Protein (Kallio et al., 1999). Assays, auf Reportergen basierend, haben die Limitierung, dass andere Transkriptionsfaktoren als HIF-1 die Expression der Reportergene beeinflussen können. Da PC12-Zellen in Suspension Tumorzellen und NGF behandelte PC12-Zellen differenzierte, neuron-ähnliche Zellen darstellen, ist es durchaus möglich, dass andere Phänotyp-spezifische Faktoren zu der beobachteten Verminderung der HIF-1-Aktivität durch NGF beitragen. Tumorzellen haben aufgrund ihrer hohen glykolytischen Aktivität eine höhere Resistenz gegenüber Hypoxie. Es ist auch bekannt, dass Tumorzellen eine hohe HIF-1-Aktivität haben, welche eventuell zu deren vermehrter Hypoxie-Resistenz beiträgt (Ryan et al., 1998). Generell sind differenzierte Zellen empfindlicher gegenüber Hypoxie als undifferenzierte Zellen. Der Fakt, dass sich in Zellen in Suspensionskulturen, genau wie in adhärenz gewachsenen Kulturen, welche eine reduzierte HIF-1-Aktivität aufweisen, die Hypoxieempfindlichkeit erhöht, weist darauf hin, dass NGF als ein hierarchisch organisiertes Signal-Molekül fungiert.

5.2.5 Einfluss von NGF auf die HIF-1-Aktivität bei Transfektion unmittelbar vor Hypoxie

Bei den unterschiedlichen PC12-Phänotypen (SUS, KOLL-AD, KOLL-AD-NGF), die unmittelbar vor der Hypoxie transfiziert wurden, konnte kein signifikanter Unterschied in der HIF-1-Aktivität gefunden werden. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der Versuchsanordnung. Durch die Transfektion der PC12-Zellen unmittelbar vor der Hypoxie wird eher das Verhalten der Plasmide in verschiedene Phänotypen analysiert, als die HIF-1-Aktivität. Die Suspensionszellen z.B. unterscheiden sich durch ein reges Teilungsverhalten gegenüber den adhären PC12-Zellen. Bei den adhären PC12-Zellen kommt es zusätzlich zu Wechselwirkungen über transmembranale Moleküle der Plasmamembran, die mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen. Die Ligandenbindung und die Interaktion von Adhäsionsmolekülen mit dem Zytoskelett vermitteln spezifische Signale in die Zelle, über die Proliferation, Apoptose, Motilität und Differenzierung gesteuert werden. Diese Integrin-Zytoskelett-Wechselwirkungen können einen bedeutenden Einfluss auf die Transfektion und die Expression der Luciferase haben und die HIF-1-Aktivität beeinflussen. Es ist auch bekannt, dass aus der Differenzierung zu adhären, NGF-behandelten PC12-Zellen (KOLL-AD-NGF), eine unterschiedliche Genexpression resultiert, die Einfluss auf die Luciferase-Expression nehmen kann. Aussagefähig für den Einfluss von NGF auf die HIF-1-Aktivität sind daher jene Versuche, bei denen die Transfektion vor der Aussaat erfolgte und die Zellen 2 Tage nach der Transfektion einer Hypoxieexposition ausgesetzt wurden (Abb. 32).

5.2.6 Einfluss der Temperatur auf die HIF-1-Aktivität

Diese Arbeit zeigt einen Einfluss der Temperaturbedingungen auf die HIF-1-Aktivität in PC12-Zellen. Deutlich wird eine signifikante Verminderung der HIF-1-Aktivität bei einer Hyperthermie von 42°C. Die unter hyperthermischen Konditionen verminderte HIF-1-Aktivität spielt womöglich eine wichtige Rolle für den hyperthermen Zelltod. Ursächlich für die hypertherme Verminderung der HIF-1-Aktivität können die gleichen Faktoren sein, wie bei der Verminderung der HIF-1-Aktivität durch den Nervenwachstumsfaktor beschrieben. So könnte eine verminderte Bindungskapazität von HIF-1 an die Promotorregion von Reportergenen oder ein verstärkter Abbau von HIF-1 durch die Ubiquitinierung, die durch Hyperthermie aktiviert wird, beteiligt sein. Auch eine hypertherme Verminderung von Zytokinen, die zu einer Verminderung der Bindung von HIF-1 führen, ist denkbar (Hellwig-Burgel et al., 1999). Die Temperatur könnte auch einen Einfluss auf die Stabilisierung der HIF-1 mRNA und des HIF-1 Proteins haben und somit zu deren Verminderung führen.

Ein Einfluss der Temperatur auf die HIF-1-Aktivität ist in der Literatur bislang noch nicht beschrieben.

5.3 HIF-1 alpha Antisense PC12-Zellen

Vorangegangene Untersuchungen von Leclerc zeigten, dass die in der AG Prof. Gross entwickelten HIF-1 alpha Antisense PC12-Zellen in frühen Passagen zu einer Verminderung der HIF-1-Aktivität führten. Allerdings zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass der Antisense-Effekt nicht stabil ist. Nach Hypoxieexposition war eine verminderte HIF-1-Aktivität nicht kontinuierlich zu erreichen. Ursächlich könnte hierfür eine Inaktivierung des Promotors sein, wie in der Literatur bereits beschrieben (Herweijer et al., 2001; Yu und Chandrasekhar, 1997). Kano et al. (2001) beschrieben, dass während kontinuierlichen Kultivierens von PC12-Zellen spontane Mutationen auftreten, welche eine Inaktivierung des Antisense-Effektes erklären könnten.

In den Parallelversuchen der HIF-1 alpha Antisense-Einzelzellklone, die eine verminderte HIF-1-Aktivität zeigten, konnte kein Einfluss auf die Hypoxievulnerabilität festgestellt werden. Die HIF-1-Aktivität scheint nicht ausreichend vermindert zu sein, um Einfluss auf den Hypoxie-induzierten Zelltod zu nehmen.

5.4 Beziehungen zwischen HIF-1-Aktivität und dem Zelltod

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen eine Korrelation zwischen HIF-1-Aktivität und dem Hypoxie-induzierten Zelltod vermuten: PC12-Zellen mit einer verminderten HIF-1 Expression zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Hypoxie. In der Abbildung 42 ist die Beziehung zwischen der HIF-1-Aktivität und dem Zelltod anhand der Ergebnisse dieser Arbeit aus den NGF- und Temperaturversuchen zusammengefasst. Alle Versuche deuten auf die gleiche Tendenz: Eine hohe HIF-1-Aktivität vermindert den Zelltod, eine niedrige HIF-1-Aktivität vermehrt den Zelltod.

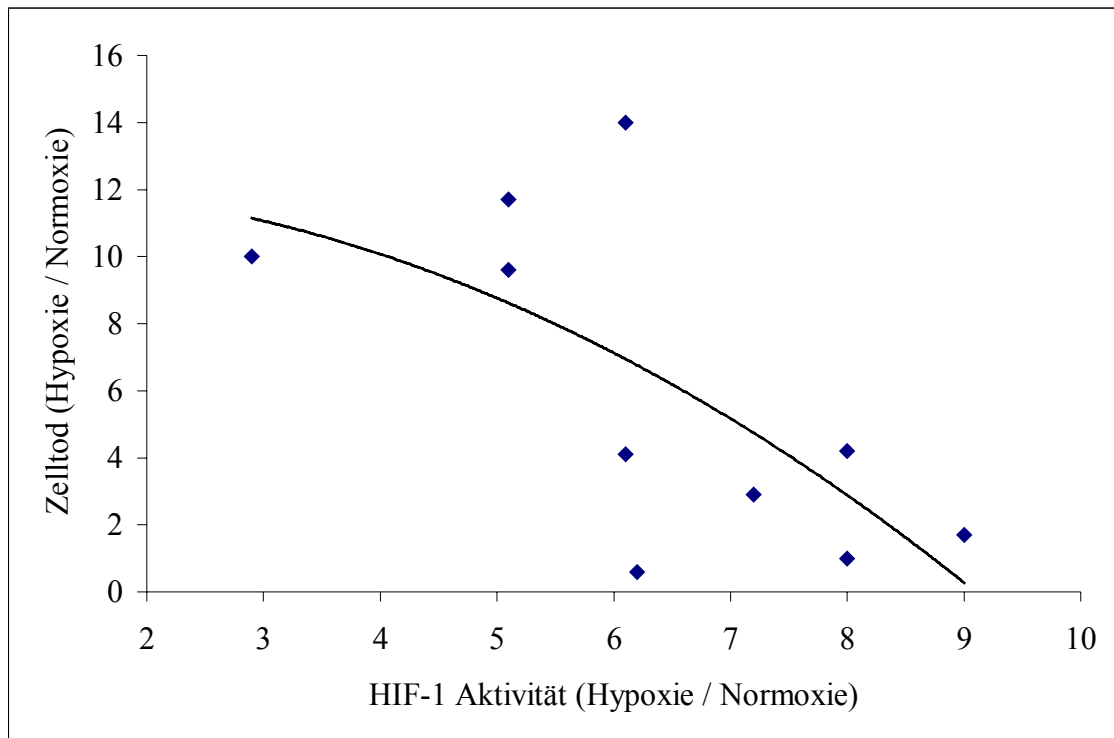


Abbildung 42: Dargestellt ist die Beziehung zwischen HIF-1-Aktivität (Hypoxie/Normoxie) und Zelltod (Hypoxie/Normoxie). Die Daten der HIF-1-Aktivität und des Zelltodes entstammen den verschiedenen Differenzierungsgraden (SUS, KOLL-AD, KOLL-AD-NGF) und den verschiedenen Temperaturen (32°C, 36°C und 42°C). Die Daten sind eine Zusammenfassung der Versuche zur Analyse des Zelltodes und der HIF-1-Aktivität der verschiedenen PC12-Phänotypen.

Gründe für die zellprotektive Wirkung einer erhöhten HIF-1-Aktivität können vielseitig sein. Unter extrem hypoxischen Bedingungen werden „pro-death“ Gene wie das Tumor Supressor Gen p53 (Banasiak und Haddad, 1998), Caspase-3 und Bax (Chae et al., 2001; Shen und White, 2001) und Fas (Felderhoff-Mueser et al., 2000) aktiviert. Neuere Studien scheinen zu bestätigen, dass es eine Verbindung zwischen p53 und HIF-1 alpha gibt. Der genaue Zusammenhang ist noch nicht vollständig geklärt. Der Mechanismus scheint abhängig von der jeweiligen Zellart zu sein. Vor kurzem zeigte Zaman et al. (1999), dass Eisenchelatoren ihre neuroprotektive Wirkung in Form von HIF-1 Aktivierung und Induktion von anderen Hypoxie- und oxidativen Stress-vermindernden Proteinen ausüben. Es ist möglich, dass eine NGF-induzierte Verminderung der HIF-1-Aktivität dementsprechend zu einer erhöhten Hypoxievulnerabilität beiträgt. Des weiteren könnte für die protektive Wirkung von HIF-1 eine Interaktion mit dem anti-apoptotischen Protein bcl-2 verantwortlich sein. Bcl-2 vermindert die Apoptose in neuronalen Zellen, wie an einer bcl-2 Antisense-Zelllinie gezeigt wurde (Banasiak et al., 1999) und der bcl-2 Gehalt von Zellen korreliert mit der HIF-1-Aktivität (Ju et al., 2002).

Die Versuche dieser Arbeit deuten darauf hin, dass mit der Modulierung der HIF-1 Expression eine klinisch anwendbare Einflussmöglichkeit besteht, die Zellen gegen Hypoxie/Ischämie zu schützen.

Allerdings wird in der Literatur auch Gegenteiliges beschrieben. An et al. (1998) zum Beispiel berichtet, dass ein direkter Zusammenhang zwischen HIF-1 alpha und dem p53-Protein besteht. In anderen Studien ist ein pro-apoptotischer Effekt von HIF-1 in embryonalen Stammzellen und kortikalen Neuronen unter Hypoxie beschrieben worden (Carmeliet et al., 1998; Halterman et al., 1999). In beiden Studien führt eine HIF-1 induzierte Aktivierung von p53 und eine Hemmung der bcl-2 Expression zum Zelltod.

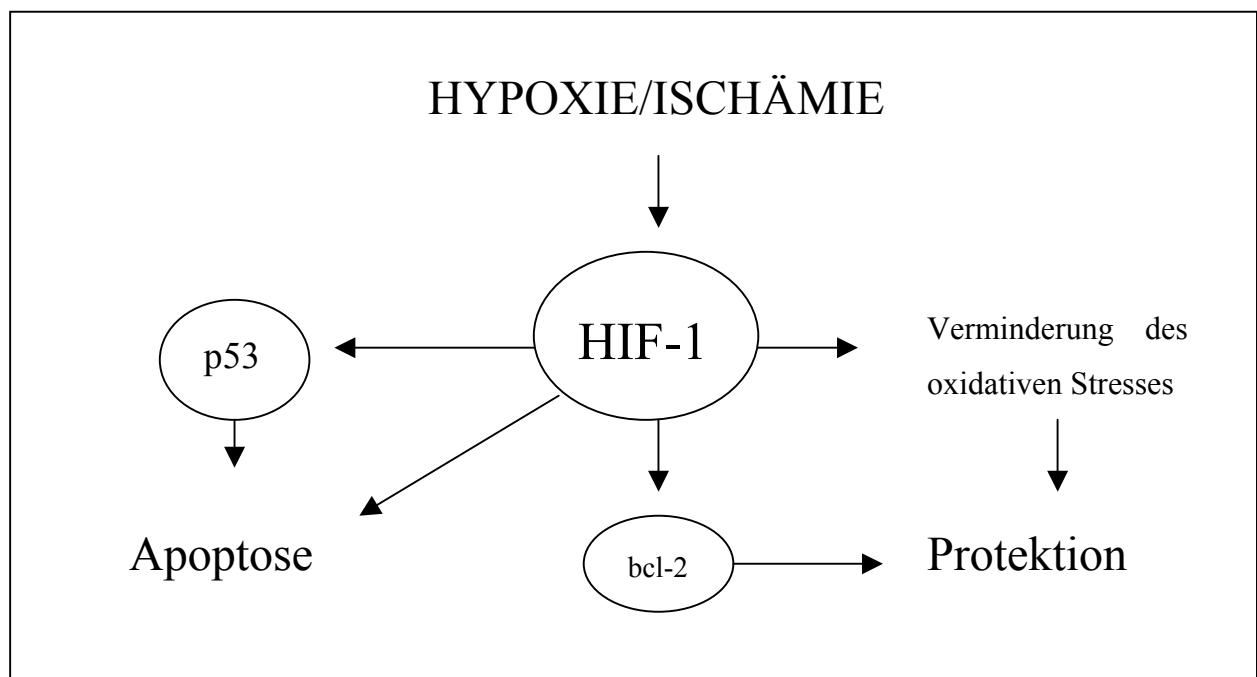


Abbildung 43: Schematische Zusammenfassung der Interaktion von Hypoxie/Ischämie, HIF-1, p53 und bcl-2. Hypoxie/Ischämie führt zu einer HIF-1 Aktivierung. Dargestellt sind die in der Literatur beschriebenen Interaktionen von HIF-1 mit verschiedenen Faktoren, die entweder zum apoptotischen Zelltod oder zu einer Zellprotektion führen.

Entscheidend für das Ausmaß der Apoptose ist die Aktivierung von Zelltod-induzierenden Proteinen, wie der Faktor p53 und das anti-apoptotische Protein bcl-2. Da sowohl NGF, als auch Hypoxie p53 aktivieren (Aloyz et al., 1998; Poluha et al., 1997; Saikumar et al., 1998), ist wahrscheinlich dieser Synergismus von NGF und Hypoxie verantwortlich für eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der Hypoxie in adhären, mit NGF behandelten Zellen (KOLL-AD-NGF).

6 Zusammenfassung

Die perinatale Hypoxie/Ischämie des Feten und Neugeborenen gehört zu den häufigsten Ursachen neuronaler Schädigung. Klinische, tierexperimentelle und zellbiologische Untersuchungen zeigen, dass der neuronale Zelltod an dieser Schädigung wesentlich beteiligt ist. Ein Schlüsselfaktor für die Anpassung von Zellen und Geweben an eine Hypoxie/Ischämie ist der hypoxia inducible factor, HIF-1. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Expression einer Reihe von Genen reguliert, die das Überleben von Zellen und Geweben während und nach einer Hypoxie/Ischämie beeinflussen.

Ziel der Arbeit war, die Beziehung zwischen Hypoxie, HIF-1-Aktivität und Zelltod zu untersuchen. Hierzu benutzten wir PC12-Zellen. Sie zeichnen sich durch Besonderheiten aus, die zur Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit von Nutzen waren. Durch Modulation der Wachstumsbedingungen der Zellkultur (Wachstum als Suspension oder Wachstum auf einer festen Oberfläche; Zusatz von Nervenwachstumsfaktor NGF zum Medium) lassen sich Phänotypen mit unterschiedlicher Vulnerabilität gegenüber Hypoxie/Ischämie erzeugen. Für die vorliegenden Untersuchungen benutzten wir vier Phänotypen: Suspensionszellen (SUS), Suspensionszellen, die mit NGF behandelt wurden (SUS-NGF; „priming“), PC12-Zellen, die adhären auf einer Kollagen-beschichteten Mikrotiterplatte wuchsen (KOLL-AD) und PC12 Zellen, die zusätzlich mit NGF behandelt wurden (KOLL-AD-NGF).

Die HIF-1-Aktivität wurde mit einem Reportergen bestimmt. Maß für die HIF-1-Aktivität war das Verhältnis zwischen der luminometrischen Aktivität des Hypoxie-sensitiven Vektors (pHBE) und dem Kontrollvektor (pGL3). Die Bestimmung des Zelltodes erfolgte überwiegend mit Hilfe von fluoreszenzaktivierter Durchflusszytometrie.

NGF verstärkte sowohl in PC12-Suspensionszellen als auch in adhären wachsenden Zellen den Hypoxie-induzierten Zelltod. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass Hypoxie sowohl Apoptose als auch Nekrose induzierte.

Unter fast allen Bedingungen, die den Zelltod durch NGF steigerten, ließ sich eine Verminderung der HIF-1-Aktivität messen: So verminderte das Primen von PC12-Zellen mit NGF in Suspension (SUS-NGF) die HIF-1-Aktivität proportional zur NGF-Konzentration. Bei 0 ng/ml NGF betrug die HIF-1-Aktivität 17 Einheiten, bei 2000 ng/ml NGF 3 Einheiten. Bei adhären wachsenden, NGF-differenzierten PC12-Zellen war die HIF-1-Aktivität gegenüber undifferenzierten Zellen ebenfalls signifikant vermindert (HIF-1 Aktivität = 7 bei PC12-Zellen ohne NGF und HIF-1 Aktivität = 5,5 bei adhären, mit NGF wachsenden Zellen). Ursächlich für die Verminderung von HIF-1 könnten sein: Eine reduzierte Bindungskapazität an die

Promotorregion von Reportergenen, ein verstärkter Abbau des HIF-1 Proteins oder eine Heterodimerisation mit Partnern von NGF-induzierten Transkriptionsfaktoren.

Um die Rolle von HIF-1 für den Zelltod weiter zu charakterisieren, benutzten wir die von Leclere entwickelte transgene PC12-Zelllinie, die mit Antisense HIF-1 alpha permanent transfiziert wurde. Es konnte keine Beziehung zwischen HIF-1 Aktivität und Zelltod nachgewiesen werden. Wahrscheinlich war die HIF-1-Aktivität nicht ausreichend vermindert, um einen Einfluss auf den Hypoxie-induzierten Zelltod nachweisen zu können. Darüber hinaus erwies sich die Hypoxie-induzierte HIF-1-Aktivität in der Antisense-Zelllinie als sehr instabil.

Die Temperatur ist ein weiterer wichtiger Faktor, der die Überlebensrate von Zellen bei Hypoxie/Ischämie beeinflusst. Es ist lange bekannt, dass Hypothermie protektiv gegenüber Hypoxie/Ischämie wirkt und Hyperthermie Zellen schädigt. Daher untersuchten wir an diesem Modell die Beziehungen von Zelltod und HIF-1 Aktivität. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte bei 36°C und 42°C einen deutlichen Anstieg des Anteils der abgestorbenen Zellen (Summe von Annexin und Propidium-Jodid gefärbten Zellen) gegenüber einer Kultur, die einer Temperatur von 32°C ausgesetzt wurde. In Parallelversuchen wurde eine signifikante Verminderung der HIF-1-Aktivität nach einer Hyperthermieexposition bei 42°C gefunden, die HIF-1-Aktivität der PC12-Zellen betrug 50% derjenigen bei 32°C.

Die vorliegenden Versuche lassen einen protektiven Einfluss von HIF-1 auf die Hypoxievulnerabilität vermuten und deuten darauf hin, dass mit der Modulierung der HIF-1-Expression eine klinisch anwendbare Einflussmöglichkeit zum Schutz der Zellen gegen Hypoxie/Ischämie besteht.

7 Verzeichnis der Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin sulfonat(6)] diammonium Salz
AG	Arbeitsgemeinschaft
Ah	Aryl hydrocarbon
ANN	Annexin
ANN+	Annexin positive Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BSG	Buffered Saline Glucose
CCLR	Cell Culture Lysis Reagent
CMV	Cytomegalie Virus
DH	Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPE	Dioleoylphosphatidyl-Ethanolamine
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
EPO	Erythropoietin
EZ4U	„Easy for you“ (nicht radioaktiver Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest), Biomedica (Wien, Österreich)
FACS	Fluorescence activated cell scanning
FKS	Fetales Kälber Serum
FL	Fluoreszenz
GABA	Gammaaminobutyric acid
GLUT-1	Glukose-Transporter 1
HIF-1	Hypoxia inducible factor 1
HLH	Helix-Loop-Helix
HRE	Hypoxia responsive elements
KOLL-AD	Adhärente Kultur auf Kollagen
KOLL-AD-NGF	Adhärente Kultur auf Kollagen mit NGF
LDH	Laktat Dehydrogenase
Luc	Luciferase
mRNA	Messenger ribonuclein acid
MTP	Mikrotiterplatten

NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NGF	Nerve growth factor, Nervenwachstumsfaktor
NO	Stickstoffmonoxid
p75 ^{NRT}	Neurotrophin Rezeptor p75
PAG	Proliferation-assoziierte-Gene
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC	Pheochromozytoma cells
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HBE	HIF-1 Bindungs-Element
PI	Propidium-Jodid
PI+	Propidium-Jodid positive Zellen
RDS	Respiratory Distress Syndrome
RLE	Relative luminometrische Einheiten
RNA	Ribonucleinacid
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Zellkulturmedium, vom Roswell Park Memorial Institute entwickelt
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SUS	Suspensions-Kultur
SUS-NGF	Suspensions-Kultur mit NGF
SV40	SimeonVirus40-Promotor
TAD	Transaktivierungsdomänen
TNF	Tumor Nekrose Faktor
trkA	Tyrosinkinase A
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wild type
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5carboxanilide)-basierendes Testverfahren
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Literaturverzeichnis

Aloyz RS, Bamji SX, Pozniak CD, Toma JG, Atwal J, Kaplan DR, Miller FD. p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J. Cell Biol.* 1998. 143:1691-1703.

An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature* 1998. 392:405-408.

Andersson K, Blum M, Chen Y, Eneroth P, Gross J, Herrera-Marschitz M, Bjelke B, Bolme P, Diaz R, Jamison L. Perinatal asphyxia increases bFGF mRNA levels and DA cell body number in the mesencephalon of rats. *Neuroreport* 1995. 6:375-378.

Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1996. 93:12969-12973.

Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* 1994. 28:1176-1179.

Banasiak KJ, Cronin T, Haddad GG. bcl-2 prolongs neuronal survival during hypoxia-induced apoptosis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1999. 72:214-225.

Banasiak KJ, Haddad GG. Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res.* 1998. 797:295-304.

Barmada MA, Moossy J, Shuman RM. Cerebral infarcts with arterial occlusion in neonates. *Ann. Neurol.* 1979. 6:495-502.

Beck I, Ramirez S, Weinmann R, Caro J. Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *J. Biol. Chem.* 1991. 266:15563-15566.

Bejar R, Vigliocco G, Gramajo H, Solana C, Benirschke K, Berry C, Coen R, Resnik R. Antenatal origin of neurologic damage in newborn infants. II. Multiple gestations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990. 162:1230-1236.

- Berger R, Bender S, Sefkow S, Klingmuller V, Kunzel W, Jensen A. Peri/intraventricular haemorrhage: a cranial ultrasound study on 5286 neonates. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1997. 75:191-203.
- Berger R, Jensen A, Krieglstein J, Steigelmann JP. Effects of acute asphyxia on brain energy metabolism in fetal guinea pigs near term. *J. Dev. Physiol* 1991. 16:9-11.
- Berger R, Jensen A, Krieglstein J, Steigelmann JP. Cerebral energy metabolism in immature and mature guinea pig fetuses during acute asphyxia. *J. Dev. Physiol* 1992. 18:125-128.
- Berger R, Jensen A, Krieglstein J, Steigelmann JP. Cerebral energy metabolism in fetal guinea pigs during moderate maternal hypoxemia at 0.75 of gestation. *J. Dev. Physiol* 1993. 19:193-196.
- Bloch A, Thoenen H. Localization of cellular storage compartments and sites of constitutive and activity-dependent release of nerve growth factor (NGF) in primary cultures of hippocampal neurons. *Mol. Cell Neurosci.* 1996. 7:173-190.
- Boniece IR, Wagner JA. Growth factors protect PC12 cells against ischemia by a mechanism that is independent of PKA, PKC, and protein synthesis. *J. Neurosci.* 1993. 13:4220-4228.
- Boniece IR, Wagner JA. NGF protects PC12 cells against ischemia by a mechanism that requires the N-kinase. *J. Neurosci. Res.* 1995. 40:1-9.
- Braiden V, Ohtsuru A, Kawashita Y, Miki F, Sawada T, Ito M, Cao Y, Kaneda Y, Koji T, Yamashita S. Eradication of breast cancer xenografts by hyperthermic suicide gene therapy under the control of the heat shock protein promotor. *Hum. Gene Ther.* 2000. 11:2453-2463.
- Bruck Y, Bruck W, Kretschmar HA, Lassmann H. Evidence for neuronal apoptosis in pontosubicular neuron necrosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1996. 22:23-29.
- Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 1987. 7:729-738.
- Caprioli J, Kitano S, Morgan JE. Hyperthermia and hypoxia increase tolerance of retinal ganglion cells to anoxia and excitotoxicity. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996. 37:2376-2381.

Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshet E, Keshet E. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998. 394:485-490.

Carter BS, Haverkamp AD, Merenstein GB. The definition of acute perinatal asphyxia. *Clin. Perinatol.* 1993. 20:287-304.

Chae HJ, Kim SC, Han KS, Chae SW, An NH, Kim HM, Kim HH, Lee ZH, Kim HR. Hypoxia induces apoptosis by caspase activation accompanying cytochrome C release from mitochondria in MC3T3E1 osteoblasts. p38 MAPK is related in hypoxia-induced apoptosis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2001. 23:133-152.

Chao MV, Bothwell M. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 2002. 33:9-12

Chen Y. Perinatal asphyxia in the rat (Dissertation). Stockholm 1997

Chen Y, Hillefors-Berglund M, Herrera-Marschitz M, Bjelke B, Gross J, Andersson K, von Euler G. Perinatal asphyxia induces long-term changes in dopamine D1, D2, and D3 receptor binding in the rat brain. *Exp. Neurol.* 1997. 146:74-80.

Chevrier-Miller M, Morange M, Arrigo AP, Pinto M. Low temperature enhancement of reporter genes expression directed by human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. 228:695-703.

Chu J, Dolnick BJ. Natural antisense (rTS α) RNA induces site-specific cleavage of thymidylate synthase mRNA. *Biochim. Biophys. Acta* 2002. 1587:183-193.

Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J. Physiol* 2000.1:11-21.

Delihis N, Rokita SE, Zheng P. Natural antisense RNA/target RNA interactions: possible models for antisense oligonucleotide drug design. *Nat. Biotechnol.* 1997. 15:751-753.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischemic stroke: an integrative view. *Trends Neurosci* 1999. 22:391-397.

Edwards SN, Tolkovsky AM. Characterization of apoptosis in cultured rat sympathetic neurons after nerve growth factor withdrawal. *J. Cell Biol.* 1994. 124:537-546.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 1992. 148:2207-2216.

Felderhoff-Mueser U, Taylor DL, Greenwood K, Kozma M, Stibenz D, Joashi UC, Edwards AD, Mehmet H. Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain. *Brain Pathol.* 2000.10:17-29.

Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 1994. 91:6496-6500.

Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J. Biol. Chem.* 1995. 270:21021-21027.

Frade JM, Barde YA. Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *Bioessays* 1998. 20:137-145.

Friede RL. *Developmental Neuropathology.* New York 1989

Friedman JE, Haddad GG. Major differences in Ca^{2+} response to anoxia between neonatal and adult rat CA1 neurons: role of Ca^{2+} and Na^{+} . *J. Neurosci.* 1993. 13:63-72.

Funato M, Tamai H, Noma K, Kurita T, Kajimoto Y, Yoshioka Y, Shimada S. Clinical events in association with timing of intraventricular hemorrhage in preterm infants. *J. Pediatr.* 1992. 121:614-619.

Futamura M, Monden Y, Okabe T, Fujita-Yoshigaki J, Yokoyama S, Nishimura S. Trichostatin A inhibits both ras-induced neurite outgrowth of PC12 cells and morphological transformation of NIH3T3 cells. *Oncogene* 1995. 10:1119-1123.

Gerner EW, Hersh EM, Pennington M, Tsang TC, Harris D, Vasanwala F, Brailey J. Heat-inducible vectors for use in gene therapy. *Int. J. Hyperthermia* 2000. 16:171-181.

Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988. 242:1412-1415.

Goldberg RN, Chung D, Goldman SL, Bancalari E. The association of rapid volume expansion and intraventricular hemorrhage in the preterm infant. *J. Pediatr.* 1980. 96:1060-1063.

Goto A, Shomori K, Ohkumo T, Tanaka F, Sato K, Ito H. Hyperthermia-induced apoptosis occurs both in a p53 gene-dependent and -independent manner in three human gastric carcinoma cell lines. *Oncol. Rep.* 1999. 6:335-339.

Green EJ, Pazos AJ, Dietrich WD, McCabe PM, Schneiderman N, Lin B, Busto R, Globus MY, Ginsberg MD. Combined postischemic hypothermia and delayed MK-801 treatment attenuates neurobehavioral deficits associated with transient global ischemia in rats. *Brain Res.* 1995. 702:145-152.

Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1976. 73:2424-2428.

Grether JK, Nelson KB. Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birth weight. *JAMA* 1997. 278:207-211.

Gross J, Muller I, Chen Y, Elizalde M, Leclere N, Herrera-Marschitz M, Andersson K. Perinatal asphyxia induces region-specific long-term changes in mRNA levels of tyrosine hydroxylase and dopamine D(1) and D(2) receptors in rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2000. 79:110-117.

Guan J, Stavridi E, Leeper DB, Iliakis G. Effects of hyperthermia on p53 protein expression and activity. *J. Cell Physiol* 2002. 190:365-374.

Halterman MW, Miller CC, Federoff HJ. Hypoxia-inducible factor-1 α mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53. *J. Neurosci.* 1999. 19:6818-6824.

Hambleton G, Wigglesworth JS. Origin of intraventricular haemorrhage in the preterm infant. *Arch. Dis. Child* 1976. 51:651-659.

Hatzoglou A, Deshayes F, Madry C, Lapree G, Castanas E, Tsapis A. Natural antisense RNA inhibits the expression of BCMA, a tumour necrosis factor receptor homologue. *BMC. Mol. Biol.* 2002. 3:4.

- Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999. 94:1561-1567.
- Herweijer H, Zhang G, Subbotin VM, Budker V, Williams P, Wolff JA. Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver. *J. Gene Med.* 2001. 3:280-291.
- Hill A. Current concepts of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term newborn. *Pediatr. Neurol.* 1991. 7:317-325.
- Holtzman DM, Sheldon RA, Jaffe W, Cheng Y, Ferriero DM. Nerve growth factor protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann. Neurol.* 1996. 39:114-122.
- Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. 245:894-899.
- Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J. Biol. Chem.* 1995. 270:19761-19766.
- Ishimaru MJ, Ikonomidou C, Tenkova TI, Der TC, Dikranian K, Sesma MA, Olney JW. Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J. Comp Neurol.* 1999. 408:461-476.
- Jensen A, Berger R. Fetal circulatory responses to oxygen lack. *J. Dev. Physiol* 1991. 16:181-207.
- Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 1996. 271:17771-17778.
- Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 1986. 47:545-554.
- Ju Y, He M, Mao B. Sequential changes of hypoxia-inducible factor 1 α in experimental spinal cord injury and its significance. *Chin J. Traumatol.* 2002. 5:103.-106.

Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 1999. 274:6519-6525.

Kano Y, Nohno T, Takahashi R, Hasegawa T, Hiragami F, Kawamura K, Motoda H, Sugiyama T. cAMP and calcium ionophore induce outgrowth of neuronal processes in PC12 mutant cells in which nerve growth factor-induced outgrowth of neuronal processes is impaired. *Neurosci. Lett.* 2001. 303:21-24.

Katoh S, Mitsui Y, Kitani K, Suzuki T. Nerve growth factor rescues PC12 cells from apoptosis by increasing amount of bcl-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. 229:653-657.

Keilhoff G, Wolf G. Comparison of double fluorescence staining and LDH-test for monitoring cell viability in vitro. *Neuroreport* 1993. 5:129-132.

Khan VR, Brown IR. The effect of hyperthermia on the induction of cell death in brain, testis, and thymus of the adult and developing rat. *Cell Stress. Chaperones.* 2002. 7:73-90.

Kietzmann T, Cornesse Y, Brechtel K, Modaressi S, Jungermann K. Perivenous expression of the mRNA of the three hypoxia-inducible factor alpha-subunits, HIF1alpha, HIF2alpha and HIF3alpha, in rat liver. *Biochem. J.* 2001. 354:531-537.

Krammer PH. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.* 1999. 71:163-210.

Kress S, Stein A, Maurer P, Weber B, Reichert J, Buchmann A, Huppert P, Schwarz M. Expression of hypoxia-inducible genes in tumor cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1998. 124:315-320.

Kume T, Nishikawa H, Tomioka H, Katsuki H, Akaike A, Kaneko S, Maeda T, Kihara T, Shimohama S. p75-mediated neuroprotection by NGF against glutamate cytotoxicity in cortical cultures. *Brain Res.* 2000. 852:279-289.

Ladoux A, Frelin C. Cardiac expressions of HIF-1 alpha and HLF/EPAS, two basic loop helix/PAS domain transcription factors involved in adaptative responses to hypoxic stresses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. 240:552-556.

Laroche JC. *Developmental Pathology of the Neonate.* New York 1977.

- Leclere N. Hypoxie induzierte Veränderungen der Genexpression der Tyrosin Hydroxylase und des Dopamin Gehaltes in Zellkulturen (Dissertation). Berlin 2000.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001. 294:1945-1948.
- Levi-Montalcini R. Nerve-growth factor in familial dysautonomia. *N. Engl. J. Med.* 1976. 295:671-673.
- Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Nerve growth factor. *Physiol Rev.* 1968. 48:534-569.
- Levy AP, Levy NS, Loscalzo J, Calderone A, Takahashi N, Yeo KT, Koren G, Colucci WS, Goldberg MA. Regulation of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *Circ.Res.* 1995. 76:758-766.
- Li H, Ko HP, Whitlock JP. Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1alpha. *J. Biol. Chem.* 1996. 271:21262-21267.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997. 91:479-489.
- Li Y, Sharov VG, Jiang N, Zaloga C, Sabbah HN, Chopp M. Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am. J. Pathol.* 1995. 146:1045-1051.
- Lindholm D, Dechant G, Heisenberg CP, Thoenen H. Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* 1993. 5:1455-1464.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996. 86:147-157.
- Lodish H. Molekulare Zellbiologie. Heidelberg 2001.
- Lu X, Lane DP. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell* 1993. 75:765-778.

- Lutz PL. Mechanisms for anoxic survival in the vertebrate brain. *Annu. Rev. Physiol* 1992. 54:601-618.
- Lyons JC, Song CW. Killing of hypoxic cells by lowering the intracellular pH in combination with hyperthermia. *Radiat. Res.* 1995. 141:216-218.
- MacManus JP, Buchan AM, Hill IE, Rasquinha I, Preston E. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci. Lett.* 1993. 164:89-92.
- Maggirwar SB, Ramirez S, Tong N, Gelbard HA, Dewhurst S. Functional interplay between nuclear factor-kappaB and c-Jun integrated by coactivator p300 determines the survival of nerve growth factor-dependent PC12 cells. *J. Neurochem.* 2000. 74:527-539.
- Mehmet H, Yue X, Squier MV, Lorek A, Cady E, Penrice J, Sarraf C, Wylezinska M, Kirkbride V, Cooper C. Increased apoptosis in the cingulate sulcus of newborn piglets following transient hypoxia-ischaemia is related to the degree of high energy phosphate depletion during the insult. *Neurosci. Lett.* 1994. 181:121-125.
- Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promotor. *J. Exp. Med.* 1995. 182:1683-1693.
- Mesner PW, Winters TR, Green SH. Nerve growth factor withdrawal-induced cell death in neuronal PC12 cells resembles that in sympathetic neurons. *J. Cell Biol.* 1992. 119:1669-1680.
- Miller JA, Miller FS, Westin B. Hypothermia in the treatment of asphyxia neonatorum. *Biol Neonate* 1964. 148-163.
- Milligan DW. Failure of autoregulation and intraventricular haemorrhage in preterm infants. *Lancet* 1980. 1:896-898.
- Mills EM, Gunasekar PG, Pavlakovic G, Isom GE. Cyanide-induced apoptosis and oxidative stress in differentiated PC12 cells. *J. Neurochem.* 1996. 67:1039-1046.
- Moody DM, Brown WR, Challa VR, Block SM. Alkaline phosphatase histochemical staining in the study of germinal matrix hemorrhage and brain vascular morphology in a very-low-birth-weight neonate. *Pediatr. Res.* 1994. 35:424-430.

- Nakamura Y, Okudera T, Fukuda S, Hashimoto T. Germinal matrix hemorrhage of venous origin in preterm neonates. *Hum. Pathol.* 1990. 21:1059-1062.
- Nilsson GE, Lutz PL. Release of inhibitory neurotransmitters in response to anoxia in turtle brain. *Am. J. Physiol* 1991. 261:R32-R37.
- Norman MG. Perinatal brain damage. *Perspect. Pediatr. Pathol.* 1978. 4:41-92.
- O'Rourke JF, Pugh CW, Bartlett SM, Ratcliffe PJ. Identification of hypoxically inducible mRNAs in HeLa cells using differential-display PCR. Role of hypoxia-inducible factor-1. *Eur. J. Biochem.* 1996. 241:403-410.
- Obin M, Mesco E, Gong X, Haas AL, Joseph J, Taylor A. Neurite outgrowth in PC12 cells. Distinguishing the roles of ubiquitylation and ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 1999. 274:11789-11795.
- Ohnishi K, Ohnishi T. Heat-induced p53-dependent signal transduction and its role in hyperthermic cancer therapy. *Int. J. Hyperthermia* 2001. 17:415-427.
- Ohtsubo T, Park HJ, Lyons JC, Ohnishi T, Song CW. Effect of acidic environment and p53 on apoptosis induction by hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* 2000. 16:481-491.
- Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 1991. 14:453-501.
- Poluha W, Schonhoff CM, Harrington KS, Lachyankar MB, Crosbie NE, Bulseco DA, Ross AH. A novel, nerve growth factor-activated pathway involving nitric oxide, p53, and p21WAF1 regulates neuronal differentiation of PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 1997. 272:24002-24007.
- Reinshagen M, Geerling I, Eysselein VE, Adler G, Huff KR, Moore GP, Lakshmanan J. Commercial recombinant human beta-nerve growth factor and adult rat dorsal root ganglia contain an identical molecular species of nerve growth factor prohormone. *J. Neurochem.* 2000. 74:2127-2133.
- Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J. Biol. Chem.* 1997. 272:20055-20062.

Rorke LB. Anatomical features of the developing brain implicated in pathogenesis of hypoxic-ischemic injury. *Brain Pathol.* 1992. 2:211-221.

Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* 1998. 17:3005-3015.

Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 1998. 17:3341-3349.

Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 1997. 272:22642-22647.

Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem.* 2001. 2:20-29.

Satoh J, Kuroda Y. Differential gene expression between human neurons and neuronal progenitor cells in culture: an analysis of arrayed cDNA clones in NTERA2 human embryonal carcinoma cell line as a model system. *J. Neurosci. Methods* 2000. 94:155-164.

Satoh T, Yamagata T, Ishikawa Y, Yamada M, Uchiyama Y, Hatanaka H. Regulation of reactive oxygen species by nerve growth factor but not Bcl-2 as a novel mechanism of protection of PC12 cells from superoxide anion-induced death. *J. Biochem. (Tokyo)* 1999. 125:952-959.

Scheller JM, Nelson KB. Twinning and neurologic morbidity. *Am. J. Dis. Child* 1992. 146:1110-1113.

Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 1998. 254:439-459.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *J. Lab Clin. Med.* 1998. 131:207-214.

Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 1994. 269:23757-23763.

Shen Y, White E. p53-dependent apoptosis pathways. *Adv. Cancer Res.* 2001. 82:55-84.

Siesjo BK. Historical overview. Calcium, ischemia, and death of brain cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1988. 522:638-661.

Silverstein FS, Boxer L, Johnston MV. Hematological monitoring during therapy with carbamazepine in children. *Ann. Neurol.* 1983. 13:685-686.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* 1999. 144:281-292.

Soulier V, Gestreau C, Borghini N, Dalmaz Y, Cottet-Emard JM, Pequignot JM. Peripheral chemosensitivity and central integration: neuroplasticity of catecholaminergic cells under hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* 1997. 118:1-7.

Stein A. Expression von Hypoxie induzierbaren Genen in Tumorzellen (Dissertation). Tübingen 2000.

Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol.* 1999. 9:93-117.

Thoresen M, Wyatt J. Keeping a cool head, post-hypoxic hypothermia--an old idea revisited. *Acta Paediatr.* 1997. 86:1029-1033.

Tietz N. Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia 1986.

Trash-Bingham CA, Tartof KD. aHIF: a natural antisense. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999. 91:143-151.

Turman MA, Rosenfeld SL. Heat shock protein 70 overexpression protects LLC-PK1 tubular cells from heat shock but not hypoxia. *Kidney Int.* 1999. 55:189-197.

Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999. 96:245-254.

Volpe JJ. Neurology of the Newborn. Philadelphia 1995.

Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF. Patterns of cell death. *Methods Achiev. Exp. Pathol.* 1988. 13:18-54.

Walton M, Sirimanne E, Reutelingsperger C, Williams C, Gluckman P, Dragunow M. Annexin V labels apoptotic neurons following hypoxia-ischemia. *Neuroreport* 1997. 8:3871-3875.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1995. 92:5510-5514.

Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 1995. 270:1230-1237.

Wenger RH, Camenisch G, Desbaillets I, Chilov D, Gassmann M. Up-regulation of hypoxia-inducible factor-1 α is not sufficient for hypoxic/anoxic p53 induction. *Cancer Res.* 1998. 58:5678-5680.

Westin B, Miller JA, Nyberg R, Wedenberg E. Neonatal asphyxia pallida treated with hypothermia alone or with hypothermia and transfusion of oxygenated blood. *Surgery* 1959. 45: 868-879.

Westin B, Nyberg R, Miller JA, Wedenberg E. Hypothermia and transfusion with oxygenated blood in the treatment of asphyxia neonatorum. *Acta Paediatr. Scand.* 1962. 139:1-80.

Wyatt JS, Thoresen M. Hypothermia treatment and the newborn. *Pediatrics* 1997. 100:1028-1030.

Yakimove K, Sann H, Schmid H, et al. Effects of GABA agonists and antagonists on temperature sensitive neurons in the rat hypothalamus. *J. Physiol.* 1996. 494:217-230.

Yonezawa M, Otsuka T, Kato T, Moriyama A, Kato KH, Asai K, Matsui N. Hyperthermic induction of apoptosis in malignant fibrous histiocytoma cells: possible involvement of a p53-independent pathway in the induction of bax gene. *J. Orthop. Sci.* 2002. 7:117-122.

Yoshimura S, Banno Y, Nakashima S, Takenaka K, Sakai H, Nishimura Y, Sakai N, Shimizu S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Nozawa Y. Ceramide formation leads to caspase-3 activation during hypoxic PC12 cell death. Inhibitory effects of Bcl-2 on ceramide formation and caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.* 1998. 273:6921-6927.

Younkin DP. Hypoxic-ischemic brain injury of the newborn--statement of the problem and overview. *Brain Pathol.* 1992. 2:209-210.

Yu XP, Chandrasekhar S. Parathyroid hormone (PTH 1-34) regulation of rat osteocalcin gene transcription. *Endocrinology* 1997. 138:3085-3092.

Zaman K, Ryu H, Hall D, O'Donovan K, Lin KI, Miller MP, Marquis JC, Baraban JM, Semenza GL, Ratan RR. Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin. *J. Neurosci.* 1999. 19:9821-9830.

Zauner W, Brunner S, Buschle M, Ogris M, Wagner E. Differential behaviour of lipid based and polycation based gene transfer systems in transfecting primary human fibroblasts: a potential role of polylysine in nuclear transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1999. 1428:57-67.

Posterbeiträge / Publikationen

- 2000 N. Leclere¹, J. Heldt¹, T. Kietzmann², N. Charlier¹, N. Andreeva, J. Gross¹. ¹Dept. of Otorhinology, Charité and ²Institute of Biochem. Mol. Cellbiol., University of Göttingen. "Changes in tyrosine hydroxylase mRNA and dopamine levels due to hypoxia and NGF in PC12 cells". Symposium Anämie und Erythropoetin, Charité. Berlin. 12./13. Mai 2000
- 2000 N. Charlier¹, N. Leclere², U. Felderhoff¹, T. Kietzmann³, J. Gross². ¹Department of Neonatology, Charité Hospital, Humboldt University Berlin ; ²Dept. of Otorhinology, Charité, Humboldt University Berlin ; ³Institute of Biochem. Mol. Cellbiol., University of Göttingen. "Hypoxia induced cell death and HIF-1 activity in untreated and NGF treated PC12 cells". 11. ESC for medical students and young doctors. Berlin. 22.-26. November 2000
- 2001 G. Halis, J. Lange, N. Charlier, U. Ricksinger, N. Vorsteher und A. D. Ebert. Endometriosezentrum Berlin; Frauenklinik im Universitätsklinikum Benjamin Franklin der FU-Berlin. „Sind die Serumwerte für Interleukin-6 und –8, sowie die Tumormarker CEA und CA 12-5 im Serum verlässliche Marker für die Endometriose ?“ Endometriose Kongress. Saarbrücken. 28.-29. Juni 2001
- 2001 N. Charlier, N. Leclere, U. Felderhoff, J. Heldt, T. Kietzmann, M. Obladen, J. Gross: „Hypoxia induced cell death and changes in HIF-1 activity in PC12 cells upon exposure to nerve growth factor“. Jahrestagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Bochum, September 2001. Biological Chemistry 2001. 382:125
- 2002 N. Charlier, N. Leclere, U. Felderhoff, J. Heldt, T. Kietzmann, M. Obladen, J. Gross. „Hypoxia-induced cell death and changes in hypoxia-inducible factor-1 activity in PC12 cells upon exposure to nerve growth factor“. Mol. Brain Res. 2002. 104:21-30.

Erklärung an Eides Statt

Die vorliegende Dissertation wurde von mir selbständig ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst. Die Dissertation ist auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Technische Unterstützung habe ich von den Mitarbeitern der AG Prof. Gross und von Frau Dr. med. Felderhoff-Mueser bekommen.

Nico Charlier, Berlin den 1.08.2003

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. J. Gross und Herrn Prof. med. M. Obladen für die Überlassung des Themas bedanken.

Des weiteren will ich mich bedanken bei Dr. rer. medic. Norbert Leclere, Dr. med. Ursula Felderhoff-Mueser, Julia Fuchs und Dr. Kurt Andersson.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Gross, der es während der Promotion verstanden hat, mich auf seine herzliche Art für die Arbeit zu begeistern.

Natürlich gilt mein Dank auch besonders meinen Eltern, die mich während der Zeit meines Studiums und während der Promotion unterstützten und es mir ermöglichten, meinen Weg einzuschlagen.